



Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente

Delibera n. 24/2018

ILCONSIGLIO SNPA

- VISTO** che, ai sensi dell'art.13 della Legge 132/2016 ed al fine di promuovere e di indirizzare lo sviluppo coordinato delle attività del Sistema nazionale, è istituito il Consiglio del Sistema Nazionale (di seguito Consiglio SNPA), presieduto dal presidente dell'ISPRA e composto dai legali rappresentanti delle agenzie e dal direttore generale dell'ISPRA;
- CONSIDERATO** che, ai sensi dell'art. 15 del DM 123/2010 ed al fine di promuovere lo sviluppo del sistema nazionale delle Agenzie e dei controlli in materia ambientale, ha operato presso ISPRA il Consiglio Federale presieduto dal Presidente dell'ISPRA e composto dal Direttore Generale dell'ISPRA e dai legali rappresentanti delle ARPA-APPA;
- CONSIDERATO** che, ai fini di cui sopra, il Consiglio Federale ha formulato e attuato programmi pluriennali delle proprie attività, articolati in piani annuali, ha adottato atti di indirizzo e raccomandazioni, sollecitato e proposto soluzioni alle criticità per un migliore funzionamento del Sistema;
- CONSIDERATO** che, ai sensi del proprio Regolamento di funzionamento, il Consiglio Federale ha approvato i prodotti del Sistema mediante delibere e raccomandazioni;
- CONSIDERATO** che, all'interno del Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente, era emersa la necessità di adottare regole condivise per conseguire obiettivi di razionalizzazione, armonizzazione ed efficacia delle attività di diffusione delle informazioni ambientali;
- VISTA** l'approvazione del Piano triennale delle attività interagenziali 2014-2016 nella seduta del Consiglio Federale del 30 giugno 2014, di cui fa parte l'Area 1 "*Formazione del dato*" coordinata da ISPRA e da ARPA Piemonte, comprendente l'attività del GdL 4 "*Predisposizione di: 1) Linee guida sulle analisi granulometriche dei sedimenti marini; 2) Linee guida sui metodi di campionamento delle matrici marine; 3) Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine*", coordinato da ISPRA;
- RITENUTO** necessario nonché opportuno portare a compimento le attività del programma triennale 2014-2016 del Consiglio Federale fino a tutto il 2017, anche per congruità rispetto alla definizione del nuovo Programma Triennale da predisporre ai sensi dell'art. 10

2009



Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente

della L. 132/16 “individuando le principali linee di intervento finalizzate ad assicurare il raggiungimento dei LEPTA nell'intero territorio nazionale”;

VISTI

i documenti prodotti dal GdL 4:

- *Linee Guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine – Idrocarburi Policiclici Aromatici e Metalli,*
- *Linee Guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine – Verifica delle metodologie ufficiali esistenti e la loro applicabilità alle matrici marine,*

allegati alla presente delibera di cui fanno parte integrante, approvati dal Comitato Tecnico Permanente per via telematica;

RITENUTO

di adottare i documenti come proposto dal predetto Gruppo di lavoro e approvati dal Comitato Tecnico Permanente per via telematica;

VISTO

l'art. 8 del Regolamento del Consiglio SNPA che definisce la rilevanza anche esterna delle deliberazioni del Consiglio, la loro immediata esecutività, fatta salva la possibilità di prevedere nel medesimo provvedimento una diversa efficacia temporale;

DELIBERA

1. Di approvare i documenti:

“Linee Guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine – Idrocarburi Policiclici Aromatici e Metalli”

“Linee Guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine – Verifica delle metodologie ufficiali esistenti e la loro applicabilità alle matrici marine”

che sono parte integrante della presente Delibera;

2. La presente delibera con i relativi allegati, ai sensi dell'art. 8 del predetto Regolamento di funzionamento è pubblicata sul sito internet di ISPRA e di ciascuna Agenzia.

Roma, 22 febbraio 2018

Il Presidente
Stefano Laporta

**FRONTESPIZIO FINALE
FORNITO
DALL'UFFICIO GRAFICA**

**LINEE GUIDA SULLE ANALISI DI SOSTANZE
PRIORITARIE IN MATRICI MARINE**

**Verifica delle metodologie ufficiali esistenti e la loro
applicabilità alle matrici marine**

Informazioni legali

Il Consiglio Federale, istituito presso l'ISPRA con il compito di promuovere lo sviluppo coordinato del Sistema Agenziale (ISPRA/ARPA/APPA) nonché per garantire omogeneità nello svolgimento dei compiti istituzionali delle Agenzie e di ISPRA stessa, ha deciso con Delibera del 29 maggio 2012 di contraddistinguere i prodotti editoriali e le iniziative frutto delle attività congiunte a carattere nazionale dell'ISPRA e delle Agenzie ambientali, con la denominazione Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente e un nuovo logo rappresentativo.

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), le Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA), le Agenzie Provinciali per la Protezione dell'Ambiente (APPA) e le persone che agiscono per loro conto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.gov.it

ISPRA, Manuali e Linee Guida **/2017
ISBN *****

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

ISPRA

Grafica di copertina:

Foto di copertina:

Coordinamento pubblicazione on-line:

Daria Mazzella

ISPRA – Area Comunicazione

(inserire data)

Times 11 pt, bold

Coordinatore Gruppo di Lavoro:

Antonella Ausili (ISPRA)

Gruppo di Lavoro:

Maria Teresa Berducci, Daniela Berto, Chiara Maggi, Elena Romano, Giulio Sesta (ISPRA)

Domenica Ventrice (ARPA Calabria)

Maria Grazia Aquila, Carmen Ventimiglia (ARPA Campania)

Paola Martini (ARPA Emilia Romagna)

Massimo Celio, Jari Falomo (ARPA Friuli Venezia Giulia)

Laura Aguzzi, Mirco Leoni (ARPA Lazio)

Sonia Albanese, Christian Tiberiade (ARPA Liguria)

Manuela Ercolessi (ARPA Marche)

Lucia Mura (ARPA Sardegna)

Fabio Caporale (ARTA Abruzzo)

Referees

Citare questo documento come segue:

Ausili A. & Gruppo di Lavoro SNPA, 2017. Analisi di sostanze prioritarie in matrici marine. Verifica delle metodologie ufficiali esistenti e la loro applicabilità alle matrici marine. ISPRA-SNPA – Manuali e Linee Guida xx/2017. Roma, xx 2017.

INDICE

1.	PREMESSA	5
2.	OBIETTIVO DELLE LINEE GUIDA	6
3.	FASE RICOGNITIVA	8
4.	ACQUE MARINE	12
4.1	Composti organici.....	12
4.1.1	Composti organoclorurati	12
4.1.2	Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)	17
4.1.3	Erbicidi	19
4.1.4	Insetticidi organofosforati	20
4.1.5	Pentaclorofenolo.....	20
4.1.6	Alchilfenoli.....	21
4.1.7	Tributilstagno.....	22
4.1.8	Difeniletere bromato (PBDE).....	23
4.1.9	Di [2-etilesilftalato]	24
4.1.10	Solventi organici	24
4.2	Metalli.....	26
5.	SEDIMENTI MARINI	29
5.1	Composti organici.....	29
5.1.1	Composti organoclorurati	29
5.1.2	Policlorobifenili (PCB).....	31
5.1.3	Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)	32
5.1.4	Diossine, Furani e Policlorobifenili diossina simile (PCB-DL).....	33
5.1.5	Organometalli (tributilstagno).....	34
5.2	Metalli.....	35
6.	ORGANISMI MARINI	39
6.1	Composti organici.....	39
6.1.1	Esaclorobutadiene (HCBd).....	39
6.1.2	Esaclorobenzene (HCB)	40
6.1.3	Fluorantene e Benzo [a] pirene	41
6.1.4	Polibromodifeniletere (PBDE)	41
6.1.5	DDT totale	42
6.2	Metalli.....	43
7.	CIRCUITI DI INTERCALIBRAZIONE	45
7.1	Acque marine.....	45
7.2	Sedimenti	45

1. PREMESSA

Il presente volume *Verifica delle metodologie ufficiali esistenti e la loro applicabilità alle matrici marine* costituisce il documento preliminare ai volumi che compongono le *Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine* risultato dalle attività condotte dal Gruppo di Lavoro n. 4 dell'Area 1 "Formazione del dato" previsto all'interno del programma triennale 2014-2016 del Sistema Nazionale di Protezione dell'Ambiente (SNPA).

Queste Linee Guida hanno come obiettivo quello di fornire metodologie, aggiornate e condivise dal SNPA, per l'analisi chimica delle sostanze appartenenti all'elenco di priorità in matrici marine, a disposizione di tutti i soggetti pubblici e privati che per varie ragioni devono eseguire una caratterizzazione o un monitoraggio ambientale, nell'ambito della normativa vigente.

In considerazione del numero di sostanze prese in considerazione e delle diverse matrici interessate, nonché delle criticità evidenziate per la determinazioni di alcune classi di queste sostanze, per le quali solo poche Agenzie riescono a raggiungere i requisiti di qualità richiesti dalle direttive europee, in particolare dall'ultimo Decreto Legislativo n. 172 del 13 ottobre 2015, si è ritenuto più pratico produrre una serie di documenti divisi per classi di sostanze.

Il presente documento riporta una ricognizione generale delle prestazioni delle metodologie analitiche utilizzate dalle impegnate nelle indagini delle aree marino-costiere per la determinazione delle sostanze prioritarie nelle diverse matrici.

2. OBIETTIVO DELLE LINEE GUIDA

A cura di Antonella Ausili

Come riportato nella premessa, l'obiettivo della *Linea guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine* è mettere a disposizione delle Agenzie e di tutti i soggetti interessati metodologie analitiche per la determinazione di sostanze prioritarie in matrici marine da aggiornare periodicamente, in grado di raggiungere i requisiti di qualità richiesti dalla normativa vigente, in particolar modo tenendo conto di tutta l'attività europea di Common Implementation Strategy (CIS) per l'attuazione della Direttiva 2000/60/CE, e di alcune direttive figlie (Direttiva 2008/105/CE, Direttiva 2013/39/CE), che ha previsto la redazione di documenti a supporto del monitoraggio chimico di ecosistemi acquatici (Guidance Document No. 19 on surface water Chemical Monitoring under the Water Framework Directive; Guidance Document No. 25 on Chemical Monitoring of Sediment and Biota under the Water Framework Directive; Guidance Document No. 32 on biota monitoring (the implementation of EQS biota under the Water Framework Directive).

Diverse sono le Direttive Europee e normative nazionali che prevedono la caratterizzazione ambientale e/o il monitoraggio di aree marino-costiere mediante il campionamento e le analisi della colonna d'acqua, dei sedimenti e degli organismi marini al fine di valutare lo stato chimico e ecologico dei corpi idrici e/o gli impatti determinati da attività produttive e antropiche (realizzazione di infrastrutture, dragaggi, ripascimenti, ecc.).

Di seguito si riportano le principali normative di riferimento, alcune delle quali già citate in precedenza, sia europee che nazionali:

- Direttiva 2000/60/CE - Istituzione di un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque;
- D.lgs. 152/2006 - Testo Unico Ambientale;
- Direttiva 2008/105/CE - Standard di qualità ambientale nel settore della politica delle acque;
- Direttiva 2009/90/CE - Specifiche tecniche per l'analisi chimica e il monitoraggio dello stato delle acque;
- D.M. 260/2010 - Regolamento recante i criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali;
- D.lgs. 219/2010 - Attuazione della Direttiva 2008/105/CE relativa a standard di qualità ambientale nel settore della politica delle acque;
- Direttiva 2013/39/CE - Modifica le direttive 2000/60/CE e 2008/105/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque;
- D.lgs. 172/2015 – Attuazione della Direttiva 2013/39/UE che modifica le direttive 2000/60/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque;
- Direttiva 2008/56/CE - Direttiva quadro sulla strategia per l'ambiente marino;
- D.lgs. 190/2010 di recepimento della Direttiva Strategia Marina;
- art. 5-bis della Legge 28 gennaio 1994 n. 84 e s.m.i. “Disposizioni in materia di dragaggio” D.M. 7 novembre 2008 “Disciplina delle operazioni di dragaggio nei siti di bonifica di interesse nazionale, ai sensi dell'articolo 1, comma 996, della legge 27 dicembre 2006, n. 296”;
- D.M. 172/2016 - Regolamento recante la disciplina delle modalità e delle norme tecniche per le operazioni di dragaggio nei siti di interesse nazionale, ai sensi dell'articolo 5-bis, comma 6, della legge 28 gennaio 1994, n. 84;
- D.M. 173/2016 - Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini;
- art. 109 del D.lgs. 152/06 “Immersione in mare di materiale derivante da attività di escavo e attività di posa in mare di cavi e condotte”;
- D.M. 24/01/1996 – scarico nelle acque del mare e in ambienti ad esso contigui, di materiali provenienti da escavo e altre movimentazioni.

L'attività iniziale del gruppo di lavoro è consistita nella raccolta ed elaborazione delle informazioni relative alle metodologie analitiche impiegate dalle Agenzie per la determinazione delle sostanze prioritarie per poi proseguire con la stesura delle Linee guide in cui sono descritte le metodologie analitiche impiegabili nel monitoraggio chimico delle tre matrici marine, acque, sedimenti e biota.

L'iniziale raccolta di informazioni, cominciata a marzo 2005 è stata successivamente aggiornata con l'emanazione del D.lgs. n. 172 del 13 ottobre 2015. L'elaborazione di queste informazioni ha permesso di avere un quadro abbastanza completo delle metodologie effettivamente adottate dalle Agenzie per il monitoraggio chimico delle matrici marine e si è ritenuto utile dedicare ad essa un volume specifico.

3. FASE RICOGNITIVA

A cura di Antoenella Ausili

Le attività del Gruppo di Lavoro sono iniziate nel febbraio 2015, con una fase di ricognizione delle metodologie analitiche utilizzate dalle Agenzie per la determinazione delle sostanze prioritarie nelle tre matrici marine. A tale scopo è stato predisposto e distribuito un questionario per ciascuna matrice (Tabella 1, Tabella 2, Tabella 3) per raccogliere informazioni sulle metodologie analitiche utilizzate, sui limiti di quantificazione e sulle eventuali partecipazioni a circuiti d'intercalibrazione.

L'elenco delle sostanze prioritarie e le matrici marine su cui ricercarle, è stato definito in base alla Direttiva 2009/90/CE, recepita in Italia con il Decreto Legislativo 219/2010, poiché al momento della fase ricognitiva non era stato ancora emanato il Decreto Legislativo 172/2015 "*Attuazione della direttiva 2013/39/UE, che modifica le direttive 2000/60/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque*".

Quest'ultimo Decreto ha introdotto novità di rilievo riguardo agli Standard di Qualità Ambientale (SQA) di alcune sostanze prioritarie per la colonna d'acqua e per gli organismi marini, che hanno richiesto l'aggiornamento o la messa a punto di procedure analitiche più aggiornate, a causa di nuovi e più sensibili limiti di quantificazione (LOQ) da raggiungere.

Ogni Agenzia ha restituito un questionario indicante per ogni sostanza e per ogni matrice (acqua, sedimento, biota) la metodologia impiegata e il limite di quantificazione raggiunto. Diverse Agenzie successivamente, hanno inoltre fornito le informazioni di dettaglio riguardanti l'esecuzione delle metodologie.

Le risposte del questionario hanno permesso di acquisire un'informazione quasi completa sulle prestazioni analitiche e sulla copertura dei parametri da ricercare nelle singole matrici, risultando una copertura pressoché totale per acqua e sedimenti e molto parziale per gli organismi marini. Alcune Agenzie, dopo l'emanazione del D.lgs. 172/2015, hanno fornito informazioni circa l'aggiornamento delle loro metodiche in funzione dei nuovi LOQ e di conseguenza sono stati aggiornati anche i risultati derivanti dal questionario.

Dall'analisi dei dati provenienti dal questionario emerge che molte Agenzie non riescono a raggiungere per alcune sostanze il LOQ adeguato, ad esempio le difficoltà maggiori sono state evidenziate per la determinazione dei composti organoclorurati nella matrice acqua. Stesso discorso per la determinazione del benzo(a)pirene, per il quale molte Agenzie non riescono a raggiungere il LOQ nell'acqua e nel biota, a causa dei nuovi SQA definiti dal D.lgs. n. 172/2015.

Da tenere presente che lo stesso decreto considera il benzo [a] pirene nell'acqua come marcatore degli altri Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) ed è, quindi, l'unica sostanza che deve essere monitorata per lo SQA come valore medio annuo; gli altri IPA, come benzo [b] fluorantene, benzo [k] fluorantene e benzo [g,h,i] perilene devono invece essere ricercati solo come SQA-CMA (Concentrazione Massima Ammissibile).

Altri problemi sono stati riscontrati nella determinazione di cadmio e mercurio nella matrice acqua, anche se per quest'ultimo il D.lgs. n. 172/2015 ha stabilito che la matrice su cui deve essere analizzato è il biota. Analogamente agli IPA, è prevista per il mercurio la determinazione dello SQA-CMA.

Un'altra classe che presenta problemi di determinazione nella matrice acqua è quella relativa ai composti organostannici.

Una volta completata la raccolta si è proceduto con l'elaborazione delle informazioni relative alle metodologie analitiche. Ai fini della valutazione circa l'applicabilità alle matrici marine delle metodologie impiegate, si è proceduto a un raggruppamento delle sostanze per analogia di struttura chimica, di modalità di determinazione analitica e di sensibilità richiesta.

Per ogni analita è stato effettuato il confronto tra limiti di quantificazione raggiunti e requisito normativo, cioè LOQ non maggiore del 30% dello SQA (secondo D.Lgs. 219/2010 che recepisce la 2009/90/CE e attua la 2008/105/CE), in base ai valori di SQA fissati dal D.Lgs. 172/2015.

Tabella 1. *Questionario metodologie analitiche adottate nella determinazione delle sostanze pericolose e prioritarie pericolose in matrici marine secondo D.M. 260/2010 - Acque marino costiere.*

Elenco sostanze prioritarie e prioritarie pericolose	SI / NO	Limite di quantificazione	Metodologia analitica utilizzata ¹	Partecipazione a circuiti di intercalibrazione
Alaclor				
Alcani, C10-C13, cloro				
Aldrin				
Antiparassitari ciclodiene				
Antracene				
Atrazina				
Benzene				
Benzo [a] pirene				
Benzo [b] fluorantene				
Benzo [k] fluorantene				
Benzo [g,h,i] perilene				
Cadmio e composti				
Clorfenvinfos				
Clorpirifos (Clorpirifos etile)				
DDT totale				
p,p'-DDT				
1,2-Dicloroetano				
Diclorometano				
Dieldrin				
Di(2-etilesilftalato)				
Difeniletere bromato (sommatoria congeneri 28, 47, 99,100, 153 e 154)				
Diuron				
Endosulfan				
Endrin				
Esaclorobenzene				
Esaclorobutadiene				
Esaclorocicloesano				
Fluorantene				
Indeno(1,2,3-cd)pirene				
Isodrin				
Isoproturon				
Mercurio e composti				
Naftalene				
Nichel e composti				
4- Nonilfenolo				
Ottilfenolo(4-(1,1',3,3'-etrametilbutil-fenolo)				
Pentaclorobenzene				
Pentaclorofenolo				
Piombo e composti				
Simazina				
Tetracloruro di carbonio				
Tetracloroetilene				

¹ Specificare se trattasi di metodo interno allegando procedura.

Tricloroetilene
Tributilstagno composti (Tributilstagno catione)
Triclorobenzeni
Triclorometano
Trifluralin

Tabella 2. *Questionario metodologie analitiche adottate nella determinazione delle sostanze pericolose e prioritarie pericolose in matrici marine secondo D.M. 260/2010 – Sedimenti.*

Elenco sostanze prioritarie e prioritarie pericolose	SI / NO	Limite di quantificazione	Metodologia analitica utilizzata ²	Partecipazione a circuiti di intercalibrazione
Aldrin				
Alfa esaclorocicloesano				
Antracene				
Benzo [a] pirene				
Benzo [b] fluorantene				
Benzo [k] fluorantene				
Benzo [g,h,i] perilene				
Cadmio				
Cromo VI ³				
DDD				
DDE				
DDT totale				
Dieldrin				
Esaclorobenzene				
Beta esaclorocicloesano				
Fluorantene				
Esaclorobenzene				
Fluorantene				
Gamma esaclorocicloesano				
lindano				
Indenopirene				
IPA totali ⁴				
Mercurio				
Naftalene				
Nichel				
Piombo				
PCB totali ⁴				
Sommatoria T.E. PCDD, PCDF (Diossine e Furani) e PCB diossina simili ⁴				

² Specificare se trattasi di metodo interno allegando procedura.

³ Come riportato nel punto A.2.7.1 dell'allegato 1, per le sostanze PCB, Diossine, IPA totali e Cromo esavalente resta comunque l'obbligo del controllo nei sedimenti in considerazione del fatto che per dette sostanze non è stato individuato lo standard nella colonna d'acqua.

⁴ Come riportato nel punto A.2.7.1 dell'allegato 1, per le sostanze PCB, Diossine, IPA totali e Cromo esavalente resta comunque l'obbligo del controllo nei sedimenti in considerazione del fatto che per dette sostanze non è stato individuato lo standard nella colonna d'acqua.

Tabella 3. *Questionario metodologie analitiche adottate nella determinazione delle sostanze pericolose e prioritarie pericolose in matrici marine secondo D.M. 260/2010 – Biota.*

Elenco sostanze prioritarie e prioritarie pericolose	SI / NO	Limite di quantificazione	Metodologia analitica utilizzata⁵	Partecipazione a circuiti di intercalibrazione
Acido perfluorottano solfonico e derivati (PFOS) ⁶				
Benzo [a] pirene ⁶				
Dicofol ⁶				
Difenileteri bromurati ⁶				
Eptacloro ed eptacloroepossido ⁶				
Esabromociclododecano (HBCDD) ⁶				
Esaclorobenzene				
Esaclorobutadiene				
Fluorantene ⁶				
Mercurio e composti				
Sommatoria T.E. PCDD, PCDF e PCB diossina simili ⁶				

⁵ Specificare se trattasi di metodo interno allegando procedura.

⁶ Sostanze prioritarie per le quali la Direttiva 2013/39/UE del 12 agosto 2013 ha fissato SQA relativi al biota.

4. ACQUE MARINE

Per la matrice acqua, come per le altre due matrici, il capitolo è suddiviso in due parti, nella prima saranno discusse le metodologie analitiche per la determinazione delle sostanze riconducibili ai composti organici e nella seconda saranno esaminate le procedure analitiche relative alla determinazione dei metalli.

4.1 Composti organici

A cura di Antonella Ausili, Giulio Sesta

Per la matrice acqua sono stati individuati i seguenti raggruppamenti delle sostanze:

- Composti Organoclorurati
 - o Pesticidi ciclodienici
 - o Pesticidi organoclorurati
 - o Altri composti organoclorurati
- Idrocarburi Policiclici Aromatici
- Erbicidi
- Insetticidi Organofosforati
- Pentaclorofenolo
- Alchilfenoli
- Tributilstagno
- Difeniletere bromato
- Di(2-etilesilftalato)
- Solventi organici

Per ogni raggruppamento di sostanze sono presentati i risultati relativi alle prestazioni analitiche delle metodologie impiegate dalle Agenzie.

4.1.1 Composti organoclorurati

In Tabella 4 sono riportati il valore di SQA e di LOQ nelle acque per ogni analita previsto dal D.lgs. 172/2015. Per la maggior parte dei composti organoclorurati entrambi i valori sono dell'ordine di poche unità di ng/l.

Tabella 4. *SQA e LOQ richiesti i composti organoclorurati nelle acque marine.*

Sostanza	SQA (µg/l)	LOQ (µg/l)
Aldrin	Σ 0.005	
Dieldrin	Σ 0.005	
Endrin	Σ 0.005	
Isodrin	Σ 0.005	
Esaclobutadiene	0.02	0.006
Pentaclorobenzene	0.0007	0.00021
Esaclobenzene	0.002	0.0006
Esaclocicloesano	0.002	
DDT totale	0.025	
p,p'-DDT	0.01	0.003
Endosulfan	0.0005	0.00015

Per alcuni analiti raggiungere il LOQ previsto richiede un livello di sensibilità analitica estremamente elevata e di conseguenza numerose criticità sono emerse nel corso dell'elaborazione dei dati forniti dalle Agenzie, infatti su un totale di n. 143 prestazioni n. 72 LOQ risultano non conformi ai requisiti (Figura 1).

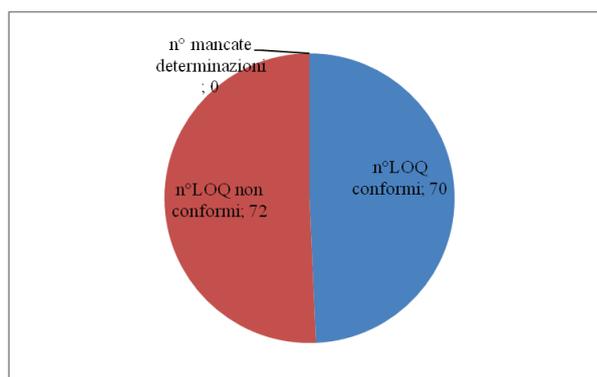


Figura 1. Conformità dei LOQ richiesti per i composti organoclorurati nelle acque marine.

Pesticidi ciclodienici

I pesticidi ciclodienici previsti dalla normativa sono quattro, lo SQA è stato definito solo per la loro somma e non per i singoli, mentre i LOQ dichiarati dalle Agenzie sono individuali. Di conseguenza la verifica dell'applicabilità delle metodologie è stata condotta effettuando il confronto tra il LOQ individuale e il requisito derivato dallo SQA per la sommatoria, il che rappresenta una situazione più favorevole ai fini del raggiungimento della conformità ai requisiti di prestazione analitica (Tabella 5). Ciononostante, a causa del valore estremamente basso dello SQA, sono emerse numerose criticità, con quasi la metà delle determinazioni non conformi ai requisiti fissati dalla normativa (Figura 2).

Derivare il LOQ obiettivo per singolo analita richiederebbe la definizione di un criterio per ricavarlo a partire dal LOQ collettivo, ma tale approccio comporterebbe comunque, nella verifica dell'applicabilità, un aumento del numero di prestazioni negative.

Tabella 5. LOQ raggiunti per i pesticidi ciclodienici nelle acque marine.

Sostanza	SQA (µg/l)	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Pesticidi ciclodiene			0.001	0.001	<0.01	0.002	0.0015			0.0005-0.1		0.0005		0.01
Aldrin	Σ 0.005	<0.05	0.001	0.001	<0.01	0.001	0.0015	0.004	0.001	0.0005-0.1	0.001	0.0005	0.005	0.01
Dieldrin		<0.05	0.001	0.001	<0.1	0.001	0.0015	0.002	0.001	0.0005-0.1	0.001	0.0005	0.005	0.01
Endrin		<0.05	0.001	0.001	<0.01	0.001	0.0015	0.004	0.01	0.0005-0.1	0.001	0.0005	0.005	0.01
Isodrin		<0.05	0.001	0.001	<0.01	0.001	0.0015	0.004	0.01	0.0005-0.1	0.001	0.0005	0.005	0.01

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo (≤ 30% dello SQA).

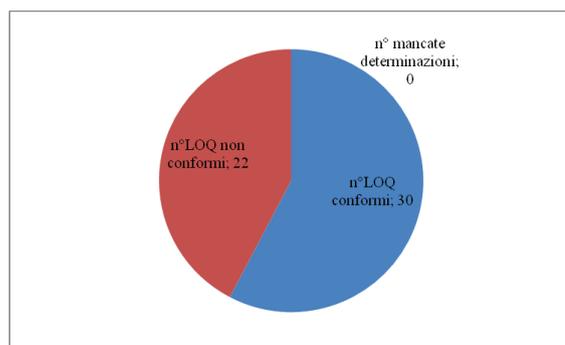


Figura 2. Conformità dei LOQ richiesti per gli pesticidi ciclodienici nelle acque marine.

Non è stato possibile svolgere in maniera esaustiva l'esame delle metodologie analitiche impiegate per individuare quelle più idonee alla determinazione di queste sostanze, in quanto non tutte le Agenzie hanno fornito i dettagli della procedura impiegata e spesso sono state dichiarate metodiche che prevedono l'esecuzione di differenti modalità di determinazione strumentale, senza specificare l'opzione effettivamente adottata.

È emersa comunque una notevole eterogeneità tra le metodologie analitiche adottate dalle Agenzie, anche circoscrivendo l'esame alle sole Agenzie che riescono a raggiungere dei LOQ conformi, troviamo metodologie basate su tecniche strumentali diverse (Tabella 6).

Tre Agenzie utilizzano per la determinazione strumentale la GC/MS/MS, tre Agenzie impiegano il metodo IRSA-CNR-APAT 5060 (che prevede tre opzioni per la determinazione strumentale GC/MS, GC/ECD e GC/NPD) anche se una di esse (ARPAC) estremizza il fattore di concentrazione estraendo 2 l di campione e concentrando l'estratto a 0.2 ml. Un'Agenzia utilizza il metodo EPA 8270 (GC/MS) e un'altra il metodo ISTISAN 07/31 Met. ISS CAC 015 (SPE GC/ECD o GC/MS).

Esaminando il caso del Dieldrin (Tabella 6) si può notare come una stessa metodologia, impiegata da Agenzie diverse, fornisca prestazioni in alcuni casi conformi ed in altri casi non conformi ai requisiti. Ciò non significa che alcune Agenzie eseguono meglio di altre la procedura analitica, ma solo che le concentrazioni in questione si collocano al limite delle possibilità del metodo.

Tabella 6. Metodologie analitiche per la determinazione del Dieldrin nelle acque marine.

Sostanza	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Dieldrin	IRSA-CNR-APAT 5060	Rapp. Istisan 07/31 Met. ISS CAC 015 rev 00	IRSA-CNR-APAT 5060	IRSA-CNR-APAT 5060	Standard Methods 6410 B mod. GC/MS/MS	MI (GC/MS/MS)	Rapp. ISTISAN 07/31 Met. ISS CAC 015 rev 00	IRSA-CNR-APAT 5060	EPA 525.3-EPA 3510c-EPA 8270d	EPA 3510C (estr. con imbuto separatore)+EPA8270D (2007) (GC/MS/MS)	IRSA-CNR-APAT 5060	EPA 3535A 2007 + Determinazione in GC/MS	IRSA-CNR-APAT 5060

In rosso i metodi che raggiungono limiti di quantificazione non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

Dall'esame delle metodologie analitiche si desume che la sensibilità analitica richiesta viene raggiunta con l'adozione di una tecnica strumentale a elevata sensibilità come la GC/MS/MS, o con l'adozione di una serie di accorgimenti nell'intera procedura analitica per estremizzare il fattore di arricchimento (elevato volume di campione estratto, concentrazione a un volume finale ben inferiore a 1 ml, iniezione di grandi volumi, ecc.) e le condizioni operative dello strumento.

Pesticidi organoclorurati

Gli analiti previsti dalla normativa riconducibili alla classe dei pesticidi organoclorurati sono cinque, lo SQA è fissato individualmente per tre di essi (Endosulfan, Esaclorobenzene e p,p'DDT), mentre per il DDT totale è fissato per la somma di quattro analiti (o,p'DDT, p,p'DDT, p,p'DDD e p,p'DDE) e per l'Esaclorocicloesano per la somma dei cinque isomeri (α , β , γ , δ e ϵ), così come è indicato dal numero CAS (608-73-1) (Tabella 1).

La verifica dell'applicabilità delle metodologie utilizzate dalle Agenzie è stata effettuata confrontando il LOQ dichiarato per ciascun parametro con quello richiesto derivato dallo SQA relativo a ciascun analita. Come nel precedente caso dei pesticidi ciclodienici, tale approccio è stato seguito anche nel caso dei due parametri costituiti da sommatorie (DDT totale e Esaclorocicloesano), non adottando quindi criteri per l'individuazione di uno SQA individuale da impiegare per il calcolo di un LOQ target individuale.

Pur rappresentando questa una situazione più favorevole ai fini del raggiungimento della conformità ai requisiti di prestazione analitica, a causa del basso valore degli SQA, sono emerse numerose criticità (Tabella 7), infatti circa la metà delle determinazioni risultano conformi al requisito di legge (Figura 3).

Tabella 7. LOQ raggiunti per i pesticidi organoclorurati nelle acque marine.

Sostanza	SQA (µg/l)	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
DDT totale	Σ 0.025	< 0.30	0.001	0.0025	<0.01	0.0009	0.0075	0.004	0.002	0.001-0.1	0.007	0.0005	0.005	0.01
p,p'-DDT	0.01	<0.05	0.001	0.0025	<0.01	0.0003	0.003	0.004	0.001	0.001-0.1	0.003	0.0005	0.005	0.01
Endosulfan	0.0005	<0.05	0.0001	0.0001	<0.1	0.0001	0.00015	0.004	0.001	0.0005-0.1	0.001	0.0005	0.005	0.01
HCB	0.02	<0.05	0.0001	0.0001	<0.01	0.0001	0.0006	0.004	0.001	0.0005-0.1	0.0006	0.001	0.005	0.01
HCH	0.002	< 0.05	0,0001	0.001	<0.01	0,0003	0,0006	0,004	0,001	0.0005-0.1	<u>0.001</u>	0.0005	0.005	0.01

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

Gli analiti che presentano maggiori difficoltà sono Endosulfan, Esaclorocicloesano e Esaclorobenzene. Nel caso dell'Endosulfan solo due Agenzie raggiungono il LOQ richiesto, mentre per le altre due sostanze solo tre Agenzie raggiungono un LOQ idoneo.

DDT totale e p,p'DDT presentano SQA leggermente più alti, anche se quasi la metà delle Agenzie non riesce a soddisfare completamente il requisito dei LOQ; tra l'altro, alcune Agenzie risultano conformi per il DDT totale, mentre non lo sono per il p,p'DDT.

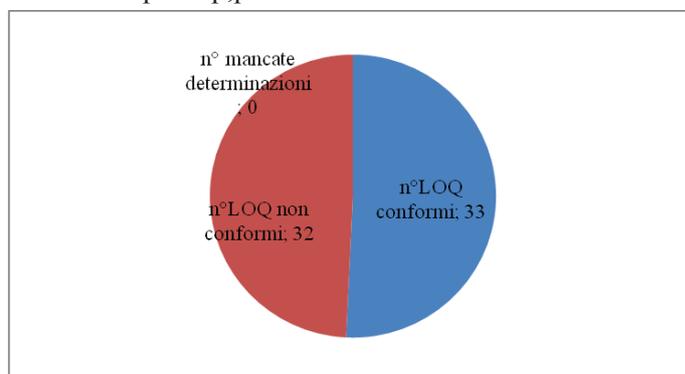


Figura 3. Conformità dei LOQ richiesti per i pesticidi organoclorurati nelle acque marine.

L'esame delle metodologie analitiche impiegate dalle Agenzie per individuare quelle più idonee alla determinazione di questi analiti non è risultato completo, perché non tutte le Agenzie hanno fornito i

dettagli della procedura impiegata e spesso sono state fornite metodiche che prevedono l'esecuzione di differenti modalità di determinazione strumentale, senza specificare l'opzione effettivamente adottata.

È comunque emersa una notevole eterogeneità tra le Agenzie e, anche circoscrivendo l'esame alle sei Agenzie che riescono a raggiungere LOQ conformi, troviamo metodologie basate su tecniche strumentali diverse. Esaminando il caso del p,p'DDT, si può notare come una stessa metodologia impiegata da Agenzie diverse, fornisca prestazioni in alcuni casi conformi e in altri casi non conformi ai requisiti (Tabella 8). Questo non significa necessariamente che alcune Agenzie eseguono meglio di altre la procedura analitica, ma solo che le concentrazioni in questione si collocano al limite delle possibilità del metodo.

Dall'esame delle metodologie analitiche si nota che la sensibilità analitica richiesta viene raggiunta o con l'adozione di una tecnica strumentale a elevata sensibilità, come la GC/MS/MS, o con l'adozione di una serie di accorgimenti nell'intera procedura analitica al fine di estremizzare il fattore di arricchimento (elevato volume di campione estratto, concentrazione a un volume finale ben inferiore a 1 ml, iniezione di grandi volumi, etc.) e le condizioni operative dello strumento.

Tabella 8. Metodologie analitiche per la determinazione del Dieldrin nelle acque marine.

Sostanza	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
p,p'DDT	APAT CNR IRSA 5060 MAN 29 2003	Rapp. Istisan 07/31 Met. ISS CAC 015 rev 00	IRSA-CNR-APAT 5060	5060 -APAT, IRSA-CNR (2003)	Standard Methods 6410 B mod. GC/MS/MS	MI (GC/MS/MS)	Rapp. ISTISAN 07/31 Met. ISS CAC 015 rev 00	APHA SM ed 21st 2005 6200 B	EPA 525.3-EPA 3510c-EPA 8270d	EPA 3510C +EPA8270D 2007 (GC/MS/MS)	APAT IRSA-CNR 2003 - 5060	EPA 3535A 2007 + Determinazione in GC/MS	APAT CNR IRSA 5060 Man 29 2003

In rosso i metodi che raggiungono limiti di quantificazione non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

Altri composti organoclorurati

Vi sono altri due composti organoclorurati non riconducibili ai raggruppamenti dei pesticidi e sono l'Esaclorobutadiene (HCBD) e il Pentaclorobenzene (PeCB). Anche per essi la verifica dell'applicabilità delle metodologie ha evidenziato numerosi LOQ non conformi ai requisiti (Figura 4, Figura 5).

Nel caso del PeCB, le difficoltà incontrate sono da ricondurre al valore dello SQA particolarmente basso (0.0007 $\mu\text{g/l}$). Solo sei Agenzie raggiungono il LOQ richiesto, tre di queste indicano il metodo utilizzato: una, impiega la GC/MS/MS, un'altra la SBSE e la terza il metodo EPA 8270 (GC/MS), anche se non sono stati forniti ulteriori dettagli sulle modalità esecutive (Tabella 6). Le altre Agenzie, alcune delle quali impiegano quest'ultimo metodo, non raggiungono la conformità.

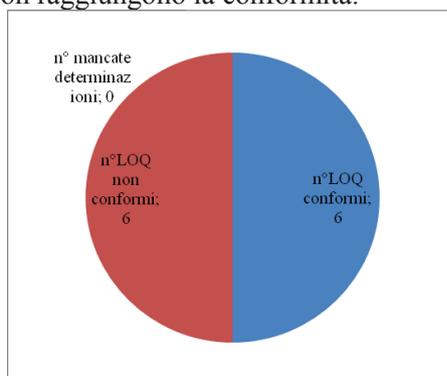


Figura 4. Conformità dei LOQ richiesti per il Pentaclorobenzene (PeCB) nelle acque marine.

Nel caso dell'Esaclorobutadiene (HCBD) i problemi riscontrati dalla quasi totalità delle Agenzie non sono riconducibili al valore dello SQA relativamente alto (0.02 µg/l), quanto alla tecnica di determinazione impiegata. Infatti, data la sua volatilità, le Agenzie lo determinano insieme ai solventi organici con tecniche specifiche per questa tipologia di analiti ma inadeguate per l'HCBD che presenta un SQA comunque molto più basso rispetto ai solventi organici.

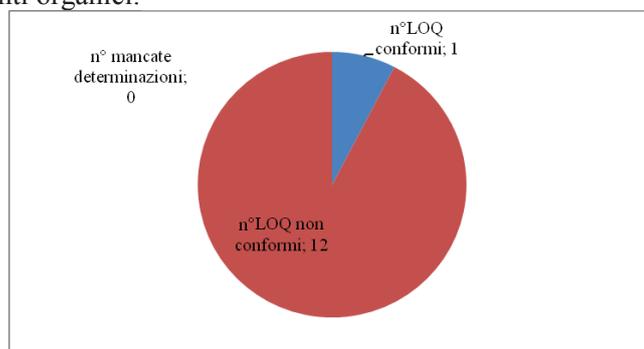


Figura 5. Conformità dei LOQ richiesti per l'Esaclorobutadiene (HCBD) nelle acque marine.

Per ottenere prestazioni migliori l'HCBD andrebbe determinato, in modo analogo agli altri composti organoclorurati menzionati, attraverso procedure estrattive e non mediante *purge&trap* o spazio di testa. Ovviamente in questo caso dovrebbe essere prestata particolare attenzione alle fasi di concentrazione dell'estratto per evitare perdite dell'HCBD.

Tabella 9. LOQ raggiunti per i pesticidi organoclorurati per le acque marine.

Sostanza	SQA (µg/l)	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
HCBD	0.02	<0.01	0.02	0.015	<0.01	0.02	0.006	0.01	0.01	0.05-0.1	0.01	0.1	0.01	0.05
PeCB	0.0007	<0.05	0,0001	0.00015	<0.01	0.0001	0.0002	0.0001-0.05	0.001	0.0005-0.1	0.0002	0.0005	0.005	0.01

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

Legenda: HCBD = Esaclorobutadiene, PeCB = Pentaclorobenzene.

4.1.2 Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

Il D.lgs. 172/2015 ha introdotto diverse novità:

- SQA più bassi per Fluorantene e Benzo [a] pirene rispetto al D.M. 260/2010;
- Benzo [b] fluorantene, Benzo [k] fluorantene, Benzo [g,h,i] perilene e Indeno [1,2,3-cd] pirene non hanno SQA-MA;
- per le prime tre sostanze di queste ultime quattro il D.lgs. 172/2015 ha introdotto lo SQA-CMA.

Tabella 10. SQA e LOQ richiesti per gli Idrocarburi Policiclici Aromatici nelle acque marine.

Sostanza	SQA (µg/l)	LOQ (µg/l)
Naftalene	2	0.6
Antracene	0.1	0.03
Fluorantene	0.0063	0.002
Benzo [a] pirene	0.00017	0.00005
Benzo [b] fluorantene	0.017 CMA	0.005
Benzo [k] fluorantene	0.017 CMA	0.005
Benzo [g,h,i] perilene	0.00082 CMA	0.00025
Indeno [1,2,3-cd] pirene		

L'abbassamento dei limiti richiesti dalla normativa per gli IPA ha determinato l'adeguamento delle metodologie da parte di molte Agenzie nel corso della definizione di queste linee guida, e in base ai dati più aggiornati, è risultato che vi sono n. 70 conformità al LOQ e n. 21 non conformità (Figura 6). Le non conformità si riferiscono principalmente al Benzo [a] pirene e Benzo [g,h,i] perilene, gli analiti che presentano i LOQ più bassi.

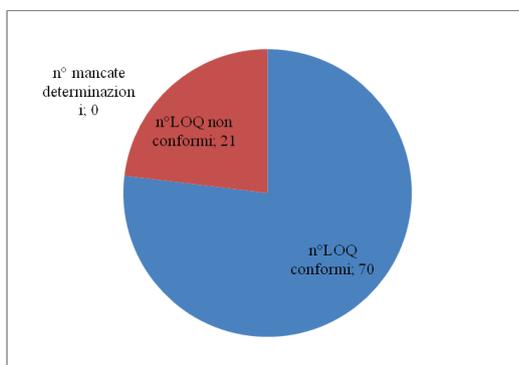


Figura 6. Conformità dei LOQ richiesti per gli IPA per le acque marine.

Solo cinque Agenzie riescono a raggiungere la conformità per l'analita che presenta il LOQ più basso, il Benzo [a] pirene: tre di queste impiegano come tecnica di determinazione strumentale la GC/MS/MS (in triplo quadrupolo), una impiega l'HPLC/FLD con un rivelatore fluorimetrico particolarmente sensibile e una impiega la SBSE. Le restanti Agenzie non riescono a raggiungere il LOQ per Benzo [a] pirene.

Tabella 11. LOQ raggiunti per gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) nelle acque marine.

Sostanza	SQA (µg/l)	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Naf	2	<0.005	0.0005	0.021	<0.005	0.001	0.6	0.0001	0.00005	0.01-0.1	0.1	0.002	0.1	0.05
Ant	0.1	<0.005	0.0005	0.022	<0.005	0.0001	0.03	0.0001	0.00005	0.0005-0.1	0.03	0.002	0.001	0.005
Flt	0.0063	<0.005	0.0005	0.002	<0.005	0.0001	0.002	0.0001	0.00005	0.0005-0.1	0.0019	0.002	0.001	0.005
B[a]P	0.00017	<0.005	0.0005	0.0017	<0.005	0.00005	0.00005	0.00005	0.00005	0.0005-0.1	0.00005	0.002	0.001	0.005
B[b]Fl	0.017 CMA	<0.005	0.0005	0.003	<0.005	0.0001	0.005	0.0001	0.00005	0.0005-0.1	0.005	0.002	0.001	0.005
B[k]Fl	0.017 CMA	<0.005	0.0005	0.003	<0.005	0.0001	0.005	0.0001	0.00005	0.0005-0.1	0.005	0.002	0.001	0.005
B[g,h,i] per	0.00082 CMA	<0.005	0.0005	0.002	<0.005	0.0001	0.002	0.0001	0.00005	0.0005-0.1	0.0025	0.002	0.0002	0.001
Ind[1,2,3-cd]pir		<0.005	0.0005	0.05	<0.005	0.0001		0.0001	0.00005	0.0005-0.1	0.0006	0.002	0.0002	0.001
metodo	Metodo interno		IRSA-CNR-APAT 5080	EPA 3510 C+ EPA 3630+ EPA 8270D	EPA 3510 + 3630 + 8270	Estrazione L/L GC/MS/MS	IRSA-CNR-APAT 5080	IRSA-CNR-APAT 5080 (SPE, HPLC/FLD)	EPA 525.3 8270 GC/MS/MS	EPA 525.3-3510c-3535-8270d	SBSE + GC/MS	IRSA-CNR-APAT 5080	EPA 5030C 2003 + EPA 8260C 2006	IRSA-CNR-APAT 5080

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

Legenda: Naf = Naftalene; Ant = Antracene; Flt = Fluorantene; B[a]P = Benzo [a] pirene; B[b]Fl = Benzo [b] fluorantene; B[k]Fl = Benzo [k] fluorantene; B[g,h,i]per = Benzo [g,h,i] perilene; Ind[1,2,3-cd]pir = Indeno [1,2,3-cd]pirene.

Dall'analisi delle metodiche impiegate dalle Agenzie è emerso che le tecniche di estrazione del campione acquoso e i fattori di concentrazione (rapporto fra volume del campione e volume finale dell'estratto) sono diversificate fra le varie Agenzie, anche fra quelle che raggiungono i LOQ conformi. Gli aspetti legati all'estrazione e concentrazione del campione non risultano essere quelli determinanti ai fini del raggiungimento della conformità al LOQ. Il fattore più importante risulta la sensibilità analitica della tecnica di determinazione strumentale impiegata.

4.1.3 Erbicidi

Le metodologie impiegate dalle Agenzie per la determinazione degli analiti riconducibili alla eterogenea classe degli erbicidi sono molto numerose e diverse tra loro inoltre, a causa dell'eterogeneità di caratteristiche chimiche, molte Agenzie non impiegano un'unica procedura per tutti i 6 composti.

Le metodologie utilizzate sono IRSA-CNR-APAT 5060 o 5050, ISTISAN 07/31 Met. ISS CAC 015, EPA 3511, EPA 3535A 2007 con determinazione in GC/MS, EPA 525.3-EPA 3510c-EPA 8270d, EPA 8321B 2007, Standard Methods 6410 e per molte di esse non sono stati forniti i dettagli sulle condizioni operative.

Le tecniche variano da estrazione liquido-liquido a estrazione in fase solida su disco o su cartuccia a preconcentrazione on line, mentre le tecniche di determinazione sono gascromatografia o cromatografia liquida con rivelazione per spettrometria di massa (anche in tandem, sia in GC che in LC), rivelatore UV o a serie di diodi, o non ulteriormente specificata. In generale, non emergono particolari criticità per il raggiungimento della conformità ai LOQ (Figura 7).

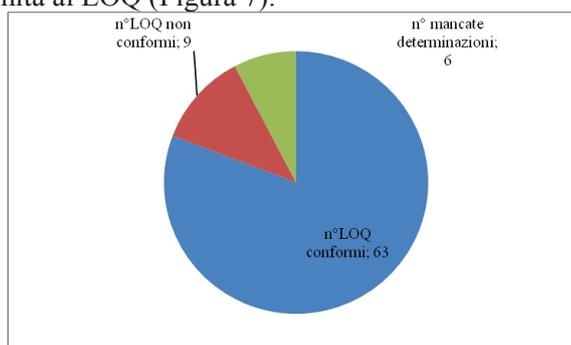


Figura 7. Conformità dei LOQ richiesti per gli erbicidi nelle acque marine.

L'analita per il quale si registra qualche difficoltà è il Trifluralin, anche se c'è da sottolineare che quattro Agenzie non raggiungono la piena conformità solo per un'inezia (LOQ = 0.01 invece di 0.009). Per Diuron e Isoproturon l'unica Agenzia che non raggiunge il LOQ richiesto utilizza HPLC con rivelatore UV (Tabella 12).

Tabella 12. LOQ raggiunti per gli erbicidi nelle acque marine.

Sostanza	SQA (µg/l)	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Atrazina	0.6	<0.025	0.001	0.006	<0.01	0.01	0.01	0.4	0.01	0.0005-0.1	0.01	0.005	0.005	0.01
Simazina	1	<0.05	0.005	0.1	<0.01	0.01	0.01	0.2	0.01	0.01-0.1	0.01	0.0005	0.005	0.01
Alaclor	0.3	<0.05	0.001	0.0025	<0.01	0.01	0.1	0.018	0.01	0.0005-0.1	0.09	0.001	0.005	0.01
Trifluralin	0.03	<0.05	0.001	0.01	<0.01	0.0003	0.009	0.008	0.01	0.0005-0.1	0.009	0.001	0.005	0.01
Diuron	0.2				<0.01	0.01	0.06	0.4	0.01	0.05	0.05	0.0005	0.005	0.01
Isoproturon	0.3				<0.01	0.01	0.01	0.4	0.01	0.05	0.01	0.0005	0.005	0.01

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

4.1.4 Insetticidi organofosforati

Le metodologie impiegate dalle Agenzie per l'analisi degli insetticidi organofosforati sono numerose: IRSA-CNR-APAT 5060, ISTISAN 07/31 Met. ISS CAC 015, EPA 3535A 2007, con determinazione strumentale in GC/MS, EPA 525.3-EPA 3510c-EPA 8270d, Standard Methods 6410, anche se, per molte di esse, non sono stati forniti i dettagli sulle condizioni operative.

Le procedure analitiche variano da estrazione liquido-liquido a estrazione in fase solida su disco o su cartuccia a preconcentrazione on line, mentre le tecniche di determinazione sono principalmente gascromatografia, cromatografia liquida con rivelazione per spettrometria di massa (anche tandem) o non è ulteriormente specificata.

La determinazione degli insetticidi organofosforati non presenta grandi difficoltà (Figura 8). Infatti, per il clorfeninfos tutte le Agenzie raggiungono il LOQ, mentre per il clorpirifos ben quattro delle cinque Agenzie con LOQ insufficiente, si discostano dalla piena conformità per un'inezia (LOQ = 0.01 invece di 0.009) (Tabella 13).

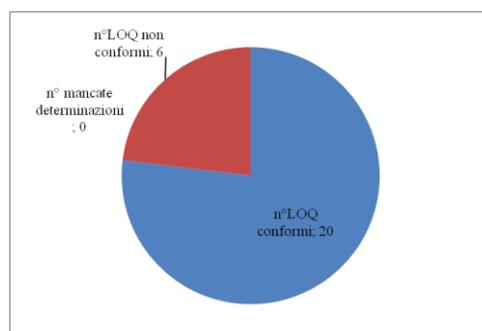


Figura 8. Conformità dei LOQ richiesti per gli insetticidi organofosforati nelle acque marine.

Tabella 13. LOQ raggiunti per gli insetticidi organofosforati nelle acque marine.

Sostanza	SQA (µg/l)	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Clorfeninfos	0.1		0.02	0.0025	<0.01	0.0003	0.01	0.006	0.01	0.0005-0.1	0.01	0.005	0.005	0.01
Clorpirifos (Clorpirifos etile)	0.03	<0.05	0.02	0.0025	<0.01	0.0003	0.01	0.006	0.01	0.0005-0.1	0.009	0.001	0.005	0.01
metodo		IRSA-CNR-APAT 5060	Rapp. Istisan 07/31 Met. ISS CAC 015 rev 00	IRSA-CNR-APAT 5060	Met. Inter. SPE LC/MS/MS	Standard Methods 6410 B mod.	MI (LC/MS/MS)	Rapp. ISTISAN 07/31 Met. ISS CAC 015 rev 00	IRSA-CNR-APAT 5060	EPA 525.3-EPA 3510c-EPA 8270d	EPA 3510C +8270D in GC/MS/MS	IRSA-CNR-APAT 5060	EPA 3535A 2007 + Det. in GC/MS	IRSA-CNR-APAT 5060

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

4.1.5 Pentaclorofenolo

Le metodologie impiegate dalle Agenzie per la determinazione del pentaclorofenolo sono numerose e diverse tra loro: Uni 10900, EPA3535A+8270D, IRSA-CNR-APAT 5060, EPA 3535A 2007 + EPA 8041A 2007, SBSE con EPA 8270, IRSA-CNR-APAT 5070, EPA 525.3-EPA 3510c-EPA 8270d.

Le tecniche di estrazione comprendono SPE, SPDE, SPME, estrazione liquido-liquido, le tecniche di analisi strumentale comprendono sia metodi in gascromatografia che in HPLC con rivelazione per spettrometria di massa. Alcune metodologie sono costituite da metodi interni non ulteriormente specificati.

La determinazione del pentaclorofenolo non presenta particolari problemi, infatti tra le Agenzie solo una non raggiunge il LOQ richiesto (Figura 9, Tabella 14).

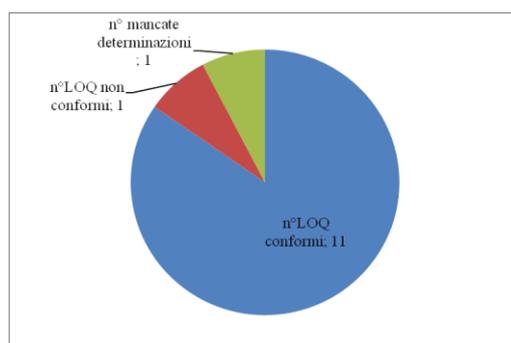


Figura 9. Conformità del LOQ richiesto per il pentaclorofenolo nelle acque marine.

Tabella 14. LOQ raggiunti per il pentaclorofenolo nelle acque marine.

Sostanza	SQA (µg/l)	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Pentaclorofenolo	0.4	< 0.05	0.1	0.029	< 0.1	0.01	0.13	0.05	0.001	0.01-0.1	0.05		0.008	0.05
metodo		IRSA-CNR-APAT 5060	Metodo Interno (Basato su APAT 5070 B)	EPA 3510C 1996+EPA 8270D 2007	EPA 8041	Metodo Interno	MI (GC/MS/MS)	EPA 3535A + EPA 8270D	(EPA 3535A 2007 + EPA 8041A 2007)	EPA 525.3-EPA 3510c-EPA 8270d	SBSE + EPA 8270	IRSA-CNR-APAT 5070 con LC/MSMS	EPA 3535A 2007 + EPA 8270D 2007	(metodo interno)

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA)

4.1.6 Alchilfenoli

Dalle informazioni raccolte emergono due diverse situazioni per gli alchilfenoli (Figura 10). Per la determinazione del Nonilfenolo non ci sono problemi, infatti le uniche due Agenzie non conformi non raggiungono il LOQ per un'inezia (Tabella 15).

Diverso il discorso per l'Ottilfenolo - [4-(1,1',3,3'-tetrametilbutil-fenolo)] che presenta un SQA ben minore e per il quale solo sei Agenzie raggiungono una conformità piena mentre altre quattro Agenzie, pur avvicinandosi al LOQ richiesto, non lo raggiungono. Tre agenzie non eseguono la determinazione per nessuno dei due analiti (Tabella 15).

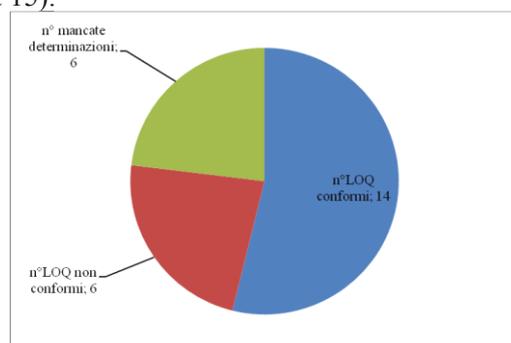


Figura 10. Conformità del LOQ richiesto per gli alchilfenoli nelle acque marine.

Tabella 15. LOQ raggiunti per gli alchilfenoli nelle acque marine.

Sostanza	SQA (µg/l)	ARTA	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
4- Nonilfenolo	0.3		0.1		<0.03	0.01	0.1	0.05-0.01	0.005	0.01-0.1	0.03		0.008	0.003
Ottilfenolo	0.01		0.01		<0.003	0.01	0.002	0.002	0.005	0.001-0.1	0.003		0.008	0.003

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

Le metodologie analitiche utilizzate sono varie e comprendono estrazione LLE, SPE, SPDE, SBSE con determinazione sia in GC/MS e GC/MS/MS che in HPLC. Da notare che alcune Agenzie utilizzano metodi che non prevedono esplicitamente l'applicabilità agli alchilfenoli (Tabella 16).

Tabella 16. Metodologie analitiche per la determinazione degli alchilfenoli nelle acque marine.

Sostanza	ARTACAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Alchilfenoli	Metodo interno (APAT 5070B, (estraz. LLE o SPE, HPLC)		EPA8041 GC/MS	Metodo interno (derivatizzazione, microestrazione. GC/MS)	MI (GC/MS/MS)	EPA3535A+EPA8270D (SPDE GC/MS)	Metodo interno per il nonilfenolo	EPA 525.3-EPA 3510c-EPA 8270d SPE, LLE GC/MS	ISO 18857 con SBSE e GC/MS		EPA 3535A 2007 + EPA 8270D (SPDE, GC/MS)	Loss et al. Chemosphere

In rosso i metodi che non prevedono esplicitamente l'applicabilità agli alchilfenoli.

4.1.7 Tributilstagno

La determinazione del tributilstagno presenta delle difficoltà dovute al basso valore di SQA. Cinque Agenzie non effettuano la determinazione, quattro Agenzie non riescono a raggiungere il LOQ richiesto (utilizzando per lo più metodi interni, tranne nel caso del metodo UNI EN ISO 17353 che però presenta un LOQ ben superiore allo SQA) e solo per quattro Agenzie la determinazione risulta conforme (Tabella 17, Figura 11).

Per la determinazione strumentale, tre delle quattro Agenzie conformi impiegano la GC/MS/MS (ARPA Marche con il metodo ISO 17353 e ARPA FVG e ARPA Lazio con metodi interni), mentre la quarta utilizza la GC/MS con un metodo interno di cui non ha fornito i dettagli.

Tabella 17. LOQ raggiunti per il tributilstagno nelle acque marine.

Sostanza	SQA (µg/l)	ABR	CAL	CAM	EMF	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Tributilstagno	0.0002				<0.02	0.00005	0.00006	0.002	0.00005	0.00001			0.005	0.002
metodo		ISO 17294-2:2005		UNI EN ISO 17353	Metodo Interno (GC/MS/MS)	Met. Int. (GC/MS/MS)	C050 - Composti organo stannici	(UNI EN ISO 17353:2006)	Metodo interno DAP Taranto GC/MS			MI/C/06/005 rev.3 2008	ISO 17353:2004 modificato	

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

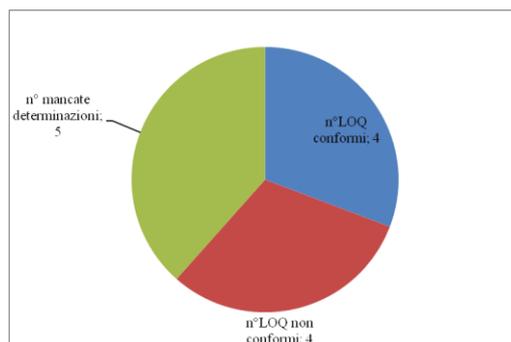


Figura 11. Conformità del LOQ richiesto per il tributilstagno nelle acque marine

4.1.8 Difenil etero bromato (PBDE)

Con l'emanazione del D.lgs. 172/2015 per il Difenil etero bromato (PBDE) non si considera più lo SQA-MA, ma solo lo SQA-CMA (concentrazione massima ammissibile) e questo rende conformi le prestazioni delle Agenzie che effettuano la determinazione che però sono soltanto otto (Tabella 18, Figura 12).

Le Agenzie utilizzano metodologie analitiche basate su tecniche strumentali quali GC/MS/MS, GC/HRMS e SBSE-GC/MS.

Tabella 18. LOQ raggiunti per il difenil etero bromato nelle acque marine.

Sostanza	SQA (µg/l)	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Difenil etero bromato 28, 47, 99, 100, 153 e 154	0.014 CMA				0.00004	0.00006	0.004	0.0002-0.02	0.00006	0.000001	0.002		0.0001	0.0001 (LB) – 0.0006 (UB)
metodo					GC/MS/MS	EPA 1614	MI (GC/MS/MS)	EPA 3535A + 8270D	ISO 22032:2006	EPA 1614	SBSE + 8270		EPA 1614 2007	EPA 1614A 2010

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

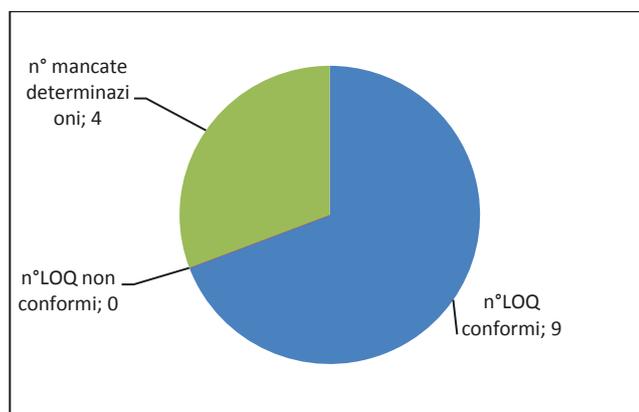


Figura 12. Conformità del LOQ richiesto per il difenil etero bromato nelle acque marine.

4.1.9 Di [2-etilesilftalato]

Per quanto riguarda il di [2-etilesilftalato] (DEHP) solo sette Agenzie lo determinano e quasi tutte raggiungono il LOQ richiesto (Tabella 19, Figura 13). Le metodologie utilizzate sono diverse tra loro ed impiegano estrazione SPE, LLE, SPDE ma tutte utilizzano come tecnica strumentale la GC/MS o GC/MS/MS.

Tabella 19. LOQ raggiunto per il di [2-etilesilftalato] nelle acque marine.

Sostanza	SQA (µg/l)	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Di(2-etilesil)ftalato (DEHP)	1.3	< 0.5			<0.2		0.43	0.01	0.005	0.1			0.4	0.1
metodo		IRSA-CNR-APAT 5060			EPA 8270 D		MI (GC/MS/MS)	EPA 3535A + 8270D	(UNI EN ISO 18856 :2006)	EPA 525.3- 3510c-3535- 8270d			EPA 3510C+ EPA 8270D	UNI EN ISO 18856: 2006

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

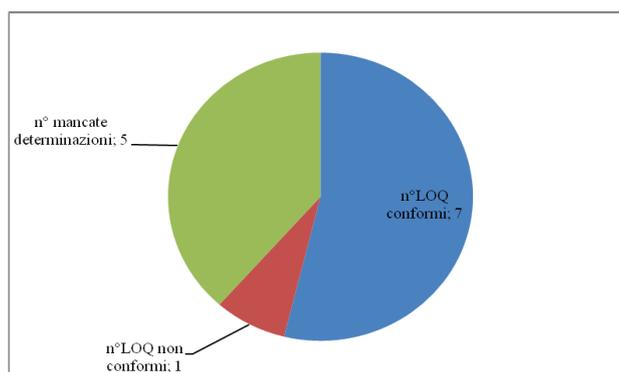


Figura 13. Conformità del LOQ richiesto per il di [2-etilesilftalato] nelle acque marine.

4.1.10 Solventi organici

Per questa classe di sostanze non sono emersi problemi nel raggiungimento del LOQ richiesto. Tutte le Agenzie eseguono le determinazioni dei solventi organici e riescono a raggiungerli (Tabella 20).

Le metodologie impiegate prevedono un'analisi con spazio di testa dinamico per la quasi totalità dei casi (una sola Agenzia impiega lo spazio di testa statico) e determinazione GC/MS. Tutte le metodologie si dimostrano idonee rispetto ai requisiti di sensibilità definiti dai valori degli SQA per tutte le sostanze.

Tabella 20. LOQ raggiunti per i solventi organici nelle acque marine.

Sostanza	SQA (µg/l)	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Diclorometano	20	< 0.5	0.05	0.03	<10	0.1	1	0.02-0.1	0.01	0.05-0.1	3	0.1	5	0.05
Triclorometano	2.5	< 0.1	0.05	0.015	<0.05	0.01	0.2	0.008-0.05	0.01	0.05-0.1	0.5	0.1	0.05	0.1
Tetracloruro di carbonio	12	< 0.05	0.05	0.015	<0.05	0.01	1	0.02-1	0.01	0.05-0.1	1	0.1	0.05	0.1
1,2-Dicloroetano	10	< 0.5	0.05	0.03	<0.3	0.01	0.5	0.008-0.1	0.01	0.05-0.1	1	0.1	0.05	0.03
Tetracloro etilene	10	< 0.1	0.05	0.015	<1	0.01	0.5	0.008-0.1	0.01	0.05-0.1	1	0.1	0.05	0.05
Tricloroetilene	10	< 0.1	0.05	0.015	<1	0.05	0.5	0.008-0.1	0.01	0.05-0.1	1	0.1	0.05	0.05
Benzene	10	< 0.3	0.05	0.03	<0.8	0.01	0.5	0.008-0.1	0.1	0.05-0.1	1	0.1	0.1	0.03
Tricloro benzeni	0.4	< 0.1	0.05	0.015	<0.05	0.01	0.1	0.008	0.05	0.05-0.1	0.1	0.1	0.1	0.05
metodo		IRSA-CNR-APAT 5140	EPA 5030B 8260 C	EPA 5030C + 8260C	EPA 5030b + 8260b	APHA Stand. Methods 6200B	EPA 5030c 8260B	EPA 5030C 8260C (labSP) APAT CNR IRSA 5140 labIM	APHA Stand. Meth.6200B	EPA 524.2-EPA 5030c-EPA 8260c UNIEN 15680	EPA 5030B + 8260C	EPA 5021 + 8260B	EPA 5030 8260c	Met. IRSA n. 1 2005 online 16-21

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

4.2 Metalli

A cura di Maria Teresa Berducci, Chiara Maggi

In Tabella 21 sono riportati il valore di SQA e di LOQ per i metalli previsti dal D.lgs. 172/2015 nelle acque marine, dove si evidenzia che entrambi i valori sono dell'ordine di μg per litro ($\mu\text{g}/\text{l}$).

Tabella 21. SQA e LOQ richiesti i metalli nelle acque marine.

Sostanza	SQA ($\mu\text{g}/\text{l}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{l}$)
cadmio e composti	0.2	0.06
mercurio e composti	0.07 CMA	0.02
nichel e composti	8.6	2.6
piombo e composti	1.3	0.4

Nel D.lgs. n. 172 del 13 ottobre 2015 è stata resa obbligatoria la determinazione del mercurio nella matrice biota, mentre nella matrice acqua è stato eliminato lo standard di qualità del mercurio ed è rimasta solo la determinazione della CMA (0.07 $\mu\text{g}/\text{ml}$). In ogni caso per verificare l'eventuale superamento della CMA in acqua è necessario definire una metodologia che corrisponda comunque ai requisiti richiesti.

Dall'esame delle metodologie impiegate dalle Agenzie sono state evidenziate criticità significative nella determinazione di cadmio, nichel, piombo e mercurio nelle acque marine. I LOQ richiesti, in alcuni casi particolarmente bassi, richiedono il raggiungimento di un elevato livello di sensibilità analitica, che va oltre le possibilità delle tecniche di determinazione strumentale tradizionalmente impiegate. Questo è il motivo principale delle criticità emerse nell'elaborazione dei dati forniti dalle Agenzie (Figura 14).

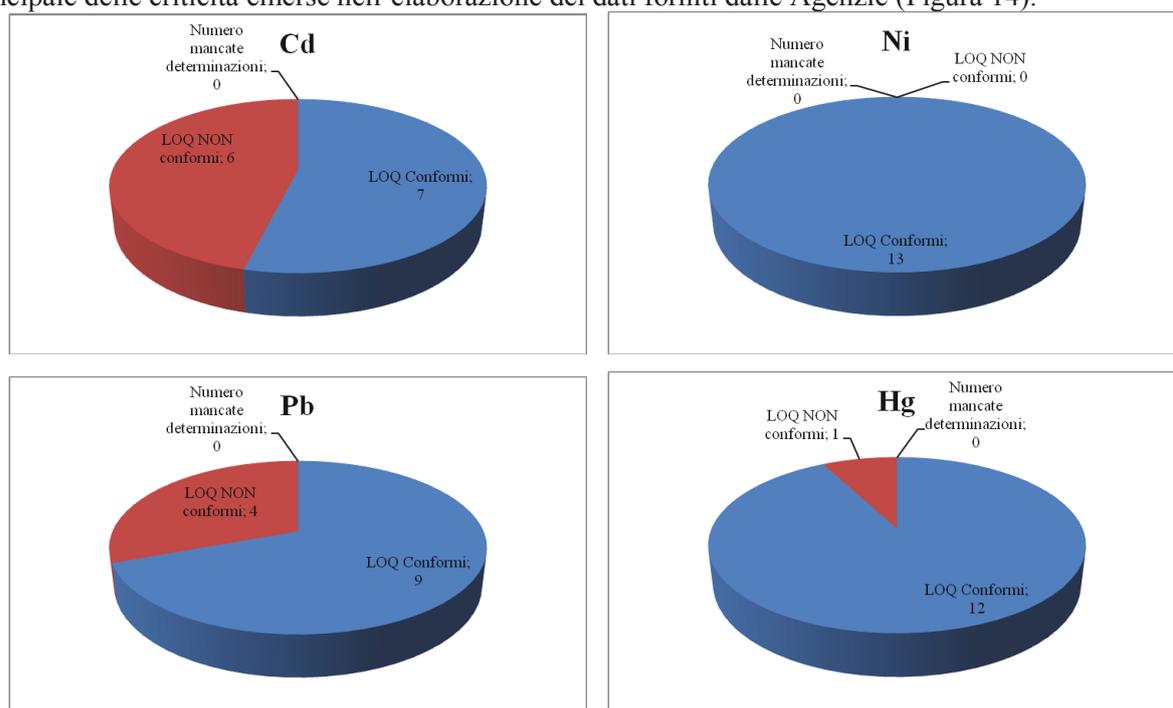


Figura 14. Conformità del LOQ richiesto per i metalli e composti nelle acque marine.

Diversi sono i metodi analitici impiegati dalle Agenzie per la determinazione del cadmio, ma nel complesso le metodologie più adoperate sono la UNI-ISO 17294-2 e la EPA 6020. Entrambi i metodi prevedono la determinazione strumentale mediante spettrometria di emissione con plasma induttivamente accoppiato e spettrometria di massa (ICP-MS).

Nonostante la sensibilità strumentale della tecnica ICP-MS sia sufficientemente elevata da consentire la determinazione dell'analita anche a concentrazioni molto basse ed in matrici particolarmente complesse

come quelle marine, diversi laboratori non riescono a raggiungere il LOQ. Viceversa, un'Agenzia adoperando una tecnica di preconcentrazione del campione seguita da una determinazione strumentale mediante ICP ottico (metodo APAT IRSA-CNR), molto meno sensibile, dichiara di raggiungere il LOQ richiesto dalla normativa (Tabella 22).

Per quanto concerne il piombo, si registra invece, una generale uniformità da parte delle Agenzie nella scelta del metodo analitico utilizzato; quasi tutte le Agenzie impiegano una metodica che prevede la determinazione strumentale mediante spettrometria di emissione con plasma induttivamente accoppiato e spettrometria di massa (ICP-MS). Anche in questo caso, nonostante la metodica scelta sia particolarmente sensibile, diversi laboratori non raggiungono il LOQ richiesto (Tabella 22).

Relativamente alla determinazione del mercurio, nel D.lgs. n. 172/2015 permane l'esigenza di raggiungere un LOQ estremamente basso legato alla necessità di determinare SQA-CMA pari a 0.07 µg/l. I laboratori delle Agenzie adoperano metodiche analitiche differenti, alcune delle quali lasciano qualche perplessità circa l'esito di raggiungimento del LOQ, senza evidenziare particolari criticità (Tabella 22). Alcune Agenzie utilizzano tecniche di pretrattamento ossidativo seguite dalla determinazione con spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) o spettrometria di assorbimento atomico con concentrazione su amalgama (DMA-80); altre utilizzano la spettrometria di fluorescenza atomica accoppiata alla tecnica dei vapori freddi (CV-AFS); altre ancora la determinazione strumentale mediante spettrometria di emissione con plasma induttivamente accoppiato e spettrometria di massa (ICP-MS).

Per il nichel, nonostante i nuovi limiti del D.lgs. n. 172/2015 siano più restrittivi, non si evidenziano criticità legate alla sua determinazione in acqua (Tabella 22).

Tabella 22. Metodologie analitiche per la determinazione dei metalli e loro composti nelle acque marine.

Sostanza	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Cd	MPI PE 40 rev 0 2012	UNI EN ISO 17294-2:2005	EPA 6020 A	UNI EN ISO 17294-2:2005 (ICP/MS)	UNI EN 17294-1+UNI EN 17294-2	UNI EN ISO 17294	UNI EN ISO 17294-2:2005	UNI EN ISO 17294-2:2005	EPA 3005a-EPA 6020a-UNI EN 17294	EPA 6020A	IRSA-CNR-APAT 3040 + IRSA-CNR-APAT 3020	APHA Standard Methods Examination of Water and Wastewater ed 22st 2012, 3125	UNI EN ISO 17294-2:2005
Hg	MPI PE 40 rev 0 2012	UNI EN ISO 17294-2:2005	EPA 6020 A	3200/A1 APAT/IRSA- Vapori freddi	EPA 1631E	MI AA su amalgama	IRSA-CNR-APAT 3200A2	UNI EN ISO 17294-2, 2005	EPA 3005a-EPA 6020a-UNI EN 17294	APAT 3200 (2003)	EPA 7473	EPA 245.7	EPA 1631E 2002
Ni	ISO 17294-2:2003	UNI EN ISO 17294-2:2005	EPA 6020 A	UNI EN ISO 17294-2:2005 (ICP/MS)	UNI EN 17294-1+UNI EN 17294-2	UNI EN ISO 17294	UNI EN ISO 17294-2:2005	UNI EN ISO 17294-2, 2005	EPA 3005a-EPA 6020a-UNI EN 17294	EPA 6020A	IRSA-CNR-APAT 3040 + IRSA-CNR-APAT 3020	APHA standard Methods for Examination of Water and Wastewater ed 22st 2012, 3125	UNI EN ISO 17294-2:2005
Pb	ISO 17294-2:2003	UNI EN ISO 17294-2:2005	EPA 6020 A	UNI EN ISO 17294-2:2005 (ICP/MS)	UNI EN 17294-1+UNI EN 17294-2	UNI EN ISO 17294	UNI EN ISO 17294-2:2005	UNI EN ISO 17294-2, 2005	EPA 3005a-EPA 6020a-UNI EN 17294	EPA 6020A	IRSA-CNR-APAT 3040 + IRSA-CNR-APAT 3020	APHA Standard Methods for Examination of Water and Wastewater ed 22st 2012, 3125	UNI EN ISO 17294-2:2005

In rosso i metodi che raggiungono limiti di quantificazione non conformi al requisito normativo (\leq al 30% dello SQA).

Si registra una generale uniformità da parte delle Agenzie nella scelta dei metodi analitici utilizzati, prevalentemente UNI-ISO e EPA; le metodiche impiegate prevedono la determinazione strumentale mediante spettrometria di emissione con plasma induttivamente accoppiato e spettrometria di massa (ICP-MS).

Tabella 23. *LOQ raggiunti per i metalli e composti nelle acque marine.*

Sostanza	SQA (µg/l)	LOQ µg/l	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Cd e composti	0.2	0.06	<0.050	0.025	0.035	<0.1	0.3	0.05	0.2	0.1	0.02	0.2	0.005	0.05	0.1
Ni e composti	8.6	2.6	0.1	2	0.1	<2	1	1	1	0.1	0.1-1	2.5	0.15	1	1
Pb e composti	1.3	0.4	<0.01	1	0.02	<1	1	1	0.05	0.1	0.1	0.4	0.3	1	0.4
Hg e composti	0.07 CMA	0.02	<0.005	0.1	0.008	<0.01	0.0005	0.02	0.01	0.003	0.01	0.01	0.01	0.01	0.002

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

5. SEDIMENTI MARINI

Nella prima parte saranno discusse le metodologie analitiche per la determinazione delle sostanze riconducibili ai composti organici e nella seconda saranno esaminate le procedure analitiche relative alla determinazione dei Metalli.

5.1 Composti organici

A cura di Antonella Ausili, Giulio Sesta

Per la matrice sedimento sono stati individuati i seguenti raggruppamenti delle sostanze:

- Composti Organoclorurati
- Policlorobifenili
- Idrocarburi Policiclici Aromatici
- Diossine
- Organometalli (tributilstagno)

Per ogni raggruppamento di sostanze sono presentati i risultati relativi alle prestazioni analitiche delle metodologie impiegate dalle Agenzie.

5.1.1 Composti organoclorurati

Gli analiti previsti per i composti organoclorurati dalla normativa sono nove, lo SQA è fissato individualmente per sei di essi, mentre per ciascun analita DDT, DDD e DDE è fissato per la somma dei due isomeri o,p' e p,p'.

In Tabella 24 sono riportati i limiti di quantificazione raggiunti e si evidenziano n. 39 non conformità rispetto a n. 77 conformità (Figura 15). Le criticità maggiori si osservano per quegli analiti il cui SQA è particolarmente basso.

Tabella 24. LOQ raggiunti per i metalli e composti nei sedimenti marini.

Sostanza	SQA (µg/kg)	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
HCB	0.4	0.1	0.05	0.1	0.1	0.01	0.1		0.01	0.01- 5	0.12	0.12	0.1	0.1
α HCH	0.2	0.1	0.05	0.1	0.1	0.01	0.1	0.05	0.02	0.01- 5	0.06	0.12	0.1	0.1
β HCH	0.2	0.1	0.05	0.1	0.1	0.01	0.1	0.05	0.02	0.01- 5	0.06	0.12	0.1	0.1
γ HCH	0.2	0.1	0.05	0.1	0.1	0.01	0.1	0.05	0.02	0.01- 5	0.06	0.12	0.1	0.1
Σ DDD	0.8	0.1	0.05	0.05	0.1	0.02	0.4	0.2	0.06	0.01- 5	0.24	0.12	0.1	0.1
Σ DDE	1.8	0.1	0.05	0.05	0.1	0.02	0.5	0.2	0.06	0.01- 5	0.54	0.12	0.1	0.1
Σ DDT	1	0.6	0.05	0.05	0.1	0.03	0.4	0.2	0.06	0.01- 5	0.3	0.12	0.1	0.1
Aldrin	0.2	0.1	0.05	0.1	0.1	0.01	0.1	0.05	0.02	0.01- 5	0.06	0.12	0.1	0.1
Dieldrin	0.2	0.1	0.05	0.1	0.1	0.1	0.1	0.05	0.05	0.01- 5	0.06	0.12	0.1	0.1

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo (≤ 30% dello SQA).

Per quanto riguarda la determinazione strumentale come si evince dalla Tabella 25, la metodica più utilizzata risulta EPA 8270 (GC/MS) utilizzata da 8 Agenzie su 13, 4 Agenzie impiegano metodiche che utilizzano la GC/ECD (due Agenzie adottano la procedura EPA 8081, una l'ISO 10382 e una l'ICRAM 2003, ma con la possibilità di eseguire la determinazione in GC/MS), mentre la GC/MS/MS è impiegata da una Agenzia solamente.

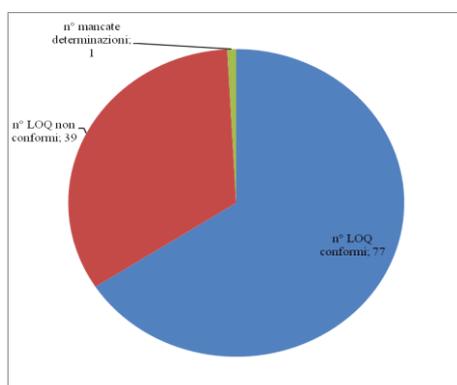


Figura 15. Conformità del LOQ richiesto per i composti organoclorurati nei sedimenti marini.

Per quanto riguarda l'estrazione 11 Agenzie su 13 impiegano l'estrazione a fluido pressurizzato (EPA 3545), mentre le restanti due dichiarano di utilizzare metodiche apparentemente non adatte alla matrice quali l'imbuto separatore (EPA 3510) e il *purge & trap* (EPA 5035).

Tabella 25. Metodologie analitiche per la determinazione dei composti organoclorurati nei sedimenti marini.

Sostanza	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Composti organoclorurati	EPA 3545A 2007 + EPA 3640A 1994 + ISO 10382:2002												
	EPA 3545A (2007), EPA 3630C (1996), EPA 8270D (2007)												
	Metod. anal. di riferim. ICRAM Scheda 8 modif. (ASE+GC/MS SIM)												
	EPA3500B+3550B+3640A+8081A+8270C Quad.Ist.Ric.Acque64. Met. Anal. fanghi Vol.3. Gen. 1988												
	EPA 3545 + EPA 8270 D (GC/MS/MS)												
	EPA 3545A+EPA 3640A+EPA 8270D												
	EPA 3510C + EPA 8081B												
	EPA 3545a 2007 + EPA 8270d 2007												
	EPA 3545-EPA 3550c-EPA 3640-EPA 8270c												
	EPA 3545A (estrazione ASE)+EPA8081B (2007)												
	IRSA-CNR-APAT 3040 + IRSA-CNR-APAT 3020												
	EPA 3545C 2007 + EPA 3640A 1994 + EPA 8270D 2007												
	EPA 3545 + EPA 8270D												

Dalla Tabella 26 si osserva che alcuni pesticidi come DDE, DDD, DDT e HCB, poiché presentano valori di SQA più alti degli altri pesticidi, hanno un numero di non conformità molto contenuto. Le difficoltà emergono su tutti gli altri composti che presentano un valore di SQA pari a 0.2 µg/kg (α , β e γ HCH, Aldrin e Dieldrin).

Per questi analiti le metodiche che raggiungono il LOQ conforme sono quelle che utilizzano come strumentazione per la determinazione la GC/ECD, come ARPAL e ARPAS o la GC/MS/MS come ARPA FVG e, molto probabilmente, Marche e Puglia. Infatti, considerati i LOQ particolarmente bassi che queste Agenzie raggiungono, è presumibile che il metodo che dichiarano (EPA 8270) sia da considerarsi eseguito in GC/MS/MS.

Tabella 26. Conformità ai LOQ per i pesticidi organoclorurati nei sedimenti marini.

Sostanza	SQA (µg/kg)	N° LOQ conformi	N° LOQ non conformi	N° mancate determinazioni
HCB	0.4	11	0	2
α HCH	0.2	5	8	0
β HCH	0.2	5	7	1
γ HCH	0.2	5	8	0
Σ DDD	0.8	12	1	0
Σ DDE	1.8	12	1	0
Σ DDT	1	11	2	0
Aldrin	0.2	5	8	0
Dieldrin	0.2	4	9	0

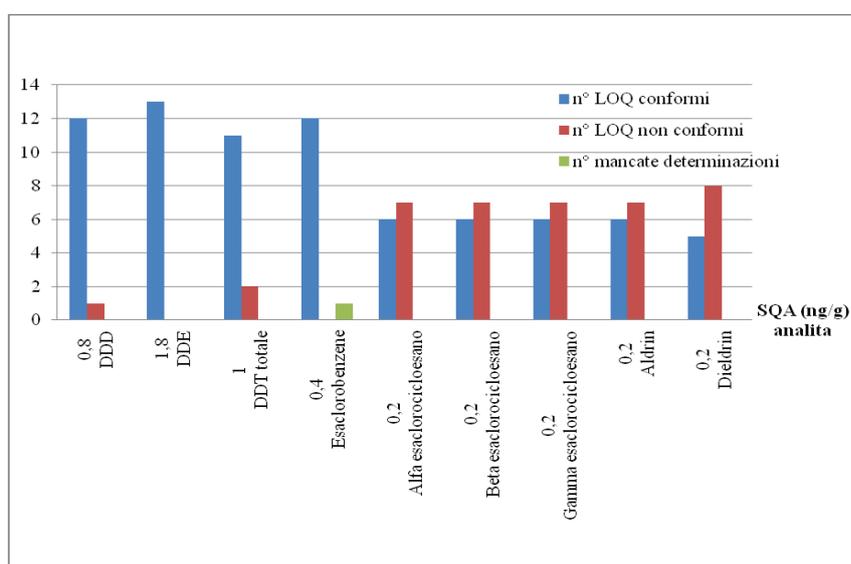


Figura 16. Conformità del LOQ richiesto per i singoli composti organoclorurati nei sedimenti marini.

5.1.2 Policlorobifenili (PCB)

Il valore dello SQA per i Policlorobifenili è fissato per la sommatoria di 13 congeneri e di conseguenza il LOQ dichiarato dalle Agenzie è riferito alla somma. Tutte le Agenzie presentano il LOQ conforme, come riportato nella Tabella 27 in cui vengono elencate anche le metodologie analitiche utilizzate.

Dato l'elevato numero di composti che concorrono al parametro, andrebbe valutata l'opzione di stabilire un criterio di sensibilità sul singolo congenere e verificare su di esso la conformità. Prendendo in considerazione altre normative nazionali, si evidenzia che il D.M. 7 novembre 2008 (Disciplina delle operazioni di dragaggio nei siti di bonifica di interesse nazionale) nonché il D.M. 15 luglio 2016 n. 173 (Regolamento per l'autorizzazione all'immersione in mare di materiali di escavo di fondali marini) richiedono un LOQ, sul singolo congenere, di 0.1 µg/kg.

Dalla Tabella 27 si nota che le tecniche strumentali impiegate dalle Agenzie sono diverse: GC/LRMS, GC/MS/MS, GC/HRMS e GC/ECD.

Tabella 27. LOQ raggiunti per i Policlorobifenili (PCB) nei sedimenti marini e metodologie analitiche utilizzate.

Sostanza	SQA (µg/kg)	ARTA	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
PCB totali	8	1.7	0.1		0.01	0.1	0.001	0.2	0.01	0.00004	2.4	0.1	0.2	0.1
metodo		ISO 10382 (ECD)	EPA 8270	EPA 8082	GC/MS/MS	GC/MS/MS	MI (GC/MS)	EPA 8082/1668	EPA 8270	EPA 1668	EPA 8270	EPA 8270	EPA 1668	EPA 8270D

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

5.1.3 Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)

Per gli IPA nei sedimenti le metodologie usate dalle Agenzie sono generalmente rispondenti ai requisiti di sensibilità per tutti i composti (97 conformità e 7 non conformità) (Figura 17).

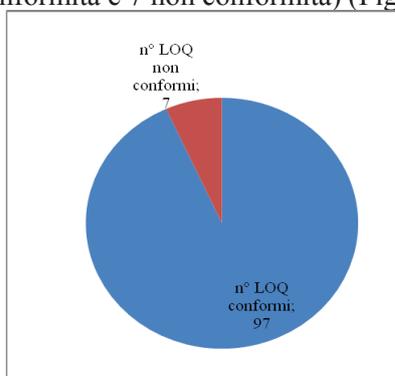


Figura 17. Conformità del LOQ richiesto per gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) nei sedimenti marini.

Tabella 28. LOQ raggiunti per gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) nei sedimenti marini e metodologie analitiche utilizzate.

Sostanza	SQA (µg/kg)	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Naf	35	5	1	2,1	2	1	0.1	0,2	0,5	0.01-5	4	1	10	15
Ant	24	5	1	2,2	2	2	0.001	0,2	0,5	0.01-5	4	1	10	15
Flt	110	5	1	0,7	2	2	0.1	0,2	0,5	0.01-5	4	1	10	15
B[a]P	30	5	1	0,9	2	2	0.01	0,2	0,5	0.01-5	4	1	10	15
B[b]Fl	40	5	1	3,5	2	2	0.01	0,2	0,5	0.01-5	4	1	10	15
B[k]Fl	20	5	1	1,5	2	2	0.01	0,2	0,5	0.01-5	4	1	10	15
B[g,h,i] per	55	5	1	4,3	2	2	0.01	0,2	0,5	0.01-5	4	1	10	15
Ind[1,2,3-cd]pyr	70	5	1	1,6	2	5	0.01	0,2	0,5	0.01-5	4	1	10	15
metodo		EPA 3545A + 3640A + 8270D	EPA 3545A + 3630C + 8270D	EPA 3550C+3630C+ 8310	EPA 3545A + 3630C+ 8270D	EPA 3545 + 8270 D	EPA 3545A + 3640A+ 8270D	EPA 3540C + 3630C + 8310	EPA 3545 + 8270d	EPA 3545 + 3550c+ 3640a+ 8270d	EPA 3545A+ 8310	US EPA 3550B+ 8270C	EPA 3545A + 8270D	ISO 13877 1998

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

Le metodologie impiegate sono EPA 8270 (9 Agenzie) e HPLC (4 Agenzie, di cui tre utilizzano EPA 8310 ed una ISO 13877). Solo nel caso di due Agenzie (ARPAV e ARPAT) vi sono delle non conformità che si ritiene siano tuttavia risolvibili in maniera relativamente agevole in quanto le metodologie impiegate sono le stesse (EPA 8270 e HPLC) adottate da altre Agenzie conformi. In Tabella 28 sono riportati i LOQ raggiunti dalle Agenzie e le metodologie analitiche utilizzate.

5.1.4 Diossine, Furani e Policlorobifenili diossina simile (PCB-DL)

La determinazione delle diossine, furani e policlorobifenili diossina simili (PCB-DL) presenta per diverse Agenzie alcune difficoltà nel raggiungere la piena conformità al requisito di sensibilità, infatti cinque Agenzie sono conformi, mentre quattro effettuano la determinazione con LOQ insufficiente e altre quattro non la effettuano affatto (Figura 18).

Esaminando la Tabella 29 si può notare come una stessa metodologia, impiegata da Agenzie diverse, fornisca prestazioni in alcuni casi conformi e in altri casi non conformi ai requisiti. Ciò non significa che alcune Agenzie eseguono meglio di altre la procedura analitica, ma solo che le concentrazioni in questione si collocano al limite delle possibilità del metodo.

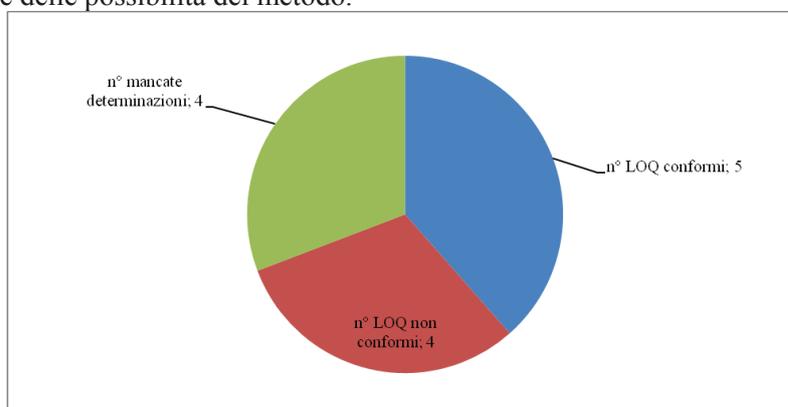


Figura 18. Conformità del LOQ richiesto per diossine, furani e PCB diossina simili (PCB-DL) nei sedimenti marini.

Tabella 29. Metodologie analitiche per la determinazione dei composti organoclorurati nei sedimenti marini.

Sostanza	SQA µg/kg	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Σ T.E. PCDD, PCDF e PCB d. s i	0.002	<0.001 I- TEQ		0.00055	0.001 8	0.00138	0.00001 -0.001	0.00005 -0.0005		0.00002 - 0.00004			0.001	Upper bound 0,0017 Medium 0.00085
		EPA 1613B 1994 + 8280B 2007				EPA 1613B 1994(GC/MS/MS)	EPA 1613 + MI (GC-MS)	EPA 1613B		EPA 1613-1668			EPA 1613B 1994 + EPA 1668C 2010	EPA 1668C 2010; EPA 1613B 1994)

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

5.1.5 Organometalli (tributilstagno)

Il valore del SQA per il Tributilstagno è fissato dal D.lgs. 172/2015 in 5 µg/kg (come catione) e con un LOQ pari a 1.5 µg/kg (come catione).

Tale parametro ha dimostrato una notevole criticità in quanto solo ARPA FVG ha inviato la metodica analitica (metodo interno basato su SPME-GC/MS) con un LOQ conforme ai requisiti normativi. ARPA Veneto ha comunicato di raggiungere un LOQ pari allo SQA con il metodo ISO 23161:2011 modificato (anch'esso basato su SPME-GC/MS).

La metodica di ARPA FVG e il metodo ICRAM (ICRAM App. 1 2001-2003), oltre all'analisi del Tributilstagno, consentono anche l'analisi dei composti di degradazione quali il Dibutilstagno e il Monobutilstagno per i quali tuttavia non sono stati fissati valori di SQA nel D.lgs. 172/2015.

5.2 Metalli

A cura di Maria Teresa Berducci, Chiara Maggi

La determinazione dei metalli nei sedimenti non presenta difficoltà analitiche, essendo gli SQA richiesti dell'ordine di mg/kg. Nella Tabella 30 vengono riportati gli SQA e i limiti di quantificazione (LOQ) richiesti per ciascun analita.

Tabella 30. SQA e LOQ richiesti per i metalli nei sedimenti marini.

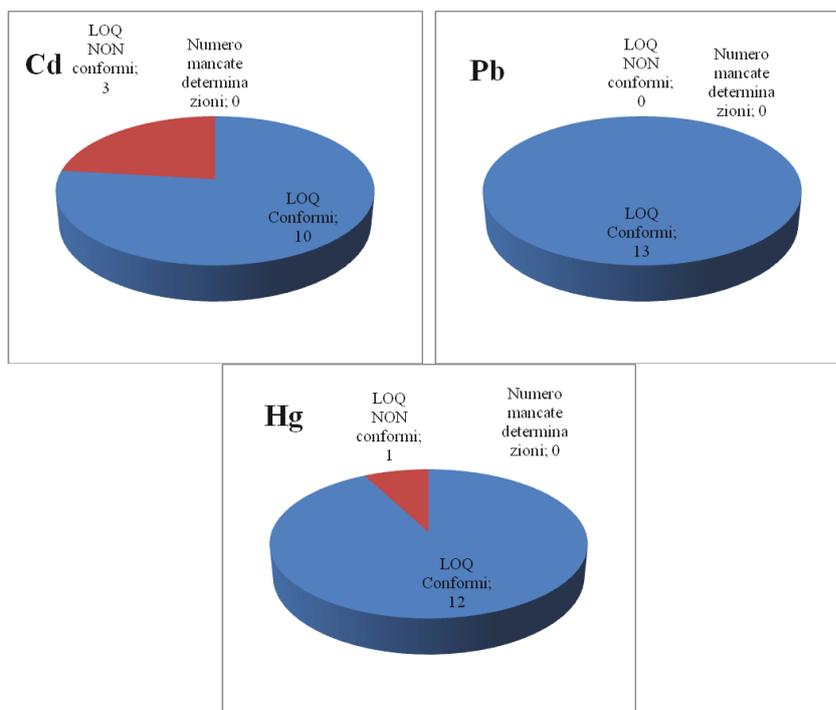
Sostanza	SQA (mg/kg s.s.)	LOQ (mg/kg s.s.)
cadmio	0.3	0.1
mercurio	0.3	0.1
nicel	30	9
piombo	30	9

Di seguito inoltre vengono riportati gli SQA e i rispettivi LOQ per altre sostanze diverse da quelle dell'elenco di priorità, previste dal D.M. 260/2010 e D.lgs. 172/2015 (Tabella 31). In particolare, per il cromo VI resta l'obbligo del controllo nei sedimenti in considerazione del fatto che non è stato individuato lo standard nella colonna d'acqua (pto A.2.7.1 all. 1 D.lgs 172/2015).

Tabella 31. SQA e LOQ richiesti per i metalli nei sedimenti marini.

Sostanza	SQA (mg/kg s.s.)	LOQ (mg/kg s.s.)
arsenico	12	3.6
cromo VI	2	0.6
cromo totale	50	15

In generale, la quasi totalità delle Agenzie riescono a determinare gli analiti nella matrice sedimento, raggiungendo un LOQ adeguato alla nuova normativa (Figura 19), non emergono particolari criticità.



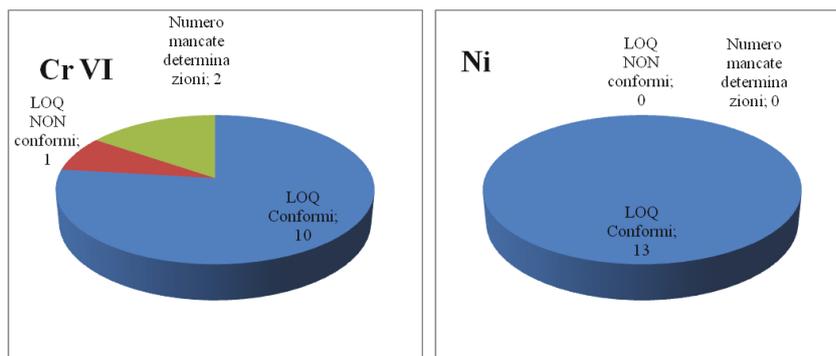


Figura 19. Conformità del LOQ richiesto per i metalli nei sedimenti marini.

Infatti, nella determinazione di nichel, mercurio e piombo, solo per il cadmio alcune Agenzie mostrano limiti di quantificazione superiori a quelli previsti per l'ottemperanza al D.lgs. 172/2015 (2013/39/EU). Non sono state fornite indicazioni relativamente alla determinazione dell'arsenico e del cromo totale.

In Tabella 32 si riportano i LOQ dichiarati dalle varie Agenzie per la determinazione dei metalli nei sedimenti marini.

Tabella 32. LOQ raggiunti per i metalli nei sedimenti marini.

Sostanza	SQA (mg/kg)	LOQ mg/kg	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
arsenico	12	3.6						4		1		1			
cadmio	0.3	0.1	<0.05	0.2	0.0003	<0.1	0.6	0.03	0.02	0.02	0.01-0.1	0.1	0.1	0.01	0.3
cromo VI	2	0.6	<0.01	0.2	0.003	0.2	0.2		0.2	0.5	0.01-5	0.6		0.2	0.2
cromo totale	50	15			0.003	1		0.25				1			
mercurio	0.3	0.1	<0.05	0.05	0.003	0.05	0.05	0.01	0.001	0.02	0.005-0.05	0.09	0.1	0.01	0.3
piombo	30	9	<1	1	0.003	<1	5	10	0.02	3	0.01-1	1	0.5	0.2	2

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

La quasi totalità delle Agenzie riescono a determinare gli analiti nella matrice sedimento, raggiungendo un LOQ adeguato alla nuova normativa. Per il Cromo VI, le dieci Agenzie che eseguono tale determinazione presentano un LOQ conforme.

Solo per il cadmio alcune Agenzie non raggiungono un LOQ idoneo al rispetto del raggiungimento dell'SQA, nonostante le metodologie applicate siano tutte idonee a tale determinazione, infatti le ARPA FVG e ARPACAL utilizzano per la determinazione strumentale la spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) mentre ARPAV invece adopera la spettrofotometria ad assorbimento atomico con fornello di grafite (GF-AAS). Nella tabella 30 si riportano i metodi impiegati dalle Agenzie regionali.

Le diverse metodiche adoperate per Cd, Pb, Ni, As e Cr, prevedono una digestione parziale del sedimento seguendo la metodica EPA 3051 o la UN ISO 11466, che prevede una mineralizzazione con miscela di acidi forti, a caldo in un sistema chiuso a microonde.

A questa segue la determinazione strumentale del contenuto dei metalli, condotta con diverse metodologie a seconda della strumentazione disponibile nelle varie Agenzie: spettrofotometria ad assorbimento atomico con fornello di grafite (GF-AAS), oppure con spettrometria di emissione atomica mediante plasma induttivamente accoppiato (ICP-OES) o spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS), seguendo ancora metodiche EPA e/o UN ISO.

La metodologia per il Cromo totale non è stata riferita dalla maggior parte delle Agenzie, tuttavia considerando gli altri analiti determinati, si suppone che la determinazione di tale elemento non presenti criticità.

La determinazione della sola frazione di cromo presente come Cr VI, normato ai fini dei monitoraggi d'indagine nei sedimenti, viene effettuata da 10 Agenzie. I metodi di estrazione del Cr VI prevedono una digestione alcalina, descritta nel metodo EPA (3060A estrazione) o una digestione rapida in acido solforico, riportata nel metodo IRSA (CNR IRSA Q64 1985). La determinazione strumentale è eseguita con cromatografia ionica o ICP-MS. Solo la Calabria usa la polarografia pulsata per tale determinazione. Il Lazio e la Sicilia non eseguono tale determinazione.

Per il Mercurio diverse Agenzie prevedono la mineralizzazione attraverso metodica EPA 3051 o con la UN ISO 11466 seguita dalla determinazione strumentale con ICP-MS o CV-AAS, altre Agenzie utilizzano la determinazione tramite Analizzatore Diretto di Mercurio (DMA-80) senza pretrattamento del campione.

Tabella 33. Metodologie analitiche impiegate per la determinazione dei metalli e loro composti nei sedimenti marini.

Sostanza	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
cadmio	MATTM+ ICRAM 2001 + EPA 6010 C 2007	EPA 3051-A + UNI EN 17294-2	EPA 3051+EPA 6020 A	UNI EN 13346/2002 + EPA 6020	EPA 3051-A + UNI EN 17294-2	EPA 3051A + EPA 6010C	EPA 3050B + EPA 6010C	EPA 3051 A 2007+EPA 6020 A 2007	EPA 3051-EPA 6020a-UNI EN 13657-UNI EN 17294	ICRAM o EPA3051 + EPA6020A	US EPA 3051 + APAT IRSA-CNR 2003 3020	EPA 3051A + APHA Standard Methods for Examination of Water and Wastewater ed 22st 2012, 3125	DM 13/9/99 Met XI.1 e XI.2+EPA + 6010C 2007
cromo VI	CNR IRSA 16 Q 64 Vol 3 1986	CNR IRSA Q 64 1985,-EPA 7198 (1986)	EPA 3060A 1996+EPA 7199 1996	EPA 3060A - EPA 7199	UNI EN 15192	C436 - ISS ARPAL	CNR IRSA Q64 1985	EPA 6020a-UNI EN 15192- IRSA CNR Q64	EPA3060A+ EPA7196 (1992) in alternativa EPA6020A	EPA 3060 1998	DM 13/9/99 Met XI.1 e XI.2+EPA 6010C 2007		
cromo totale			EPA 3051+EPA 6020A	EPA 3051A + EPA 6010C	EPA 3051A + EPA 6010C	EPA 3051 A 2007+EPA 6020 A 2007	ICRAM o EPA3051 +EPA 6020A						
mercurio	MATTM+ ICRAM 2001 + EPA 6010 C 2007+ EPA 7471 B 2007	EPA 3051-A + UNI EN 17294-2	EPA 3051+EPA 6020 A	UNI EN 13346/2002- EPA 6020	EPA 3051A + Apat Irsa CNR 3200 (A2)	EPA 3051A + Apat Irsa CNR 3200 (A2)	I CNR IRSA 16 Q 64 Met. 10 + IRSA-CNR-APAT 29/03 Met. 3200A?	EPA 3051 A 2007+EPA 6020 A 2007	EPA 3051-EPA 6020a-EPA 7473-UNI EN 13657-UNI EN 17294	ICRAM o EPA3051+APAT 3200 (2003) o in alternativa EPA 6020A (2007)	EPA 7473	EPA 7473:2007	DM 13/9/99 Met XI.1 e XI.2+EPA 6010C 2007

nichel	piombo
MATTM+ ICRAM 2001 + EPA 6010 C 2007	MATTM+ ICRAM 2001 + EPA 6010 C 2007
EPA 3051-A + UNI EN 17294-2	EPA 3051-A + UNI EN 17294-2
EPA 3051+EPA 6020A	EPA 3051+EPA 6020A
UNI EN 13346/2002- Estrazione microonde. EPA 6020	UNI EN 13346/2002-Estrazione microonde EPA 6020
EPA 3051A + EPA 6010C	EPA 3051A + EPA 6010C
EPA 3051A + EPA 6010C	EPA 3051A + EPA 6010C
EPA 3050B + EPA 6010C	EPA 3050B + EPA 6010C
EPA 3051 A 2007+EPA 6020 A 2007	EPA 3051 A 2007+EPA 6020 A 2007
EPA 3051-EPA 6020a-UNI EN 13657-UNI EN 17294	EPA 3051-EPA 6020a-EPA 7473-UNI EN 13657-UNI EN 17294
ICRAM (estrazione) o EPA3051(non per sedimenti con silicati) +EPA6020A	ICRAM (estrazione) o EPA3051(non per sedimenti con silicati) +EPA6020A
US EPA 3051 + APAT IRSA-CNR 2003 3020	US EPA 3051 + APAT IRSA-CNR 2003 3020
EPA 3051A +APHA Standard Methods for Examination of Water and Wastewater ed 21ST 2005, 3125	EPA 3051A + APHA Standard Methods for Examination of Water and Wastewater ed 22st 2012, 3125
DM 13/9/99 GU SO n° 248 21/10/99 Met XI.1 e XI.2+ EPA XI.2+EPA 6010C 2007	DM 13/9/99 GU SO n° 248 21/10/99 Met XI.1 e XI.2+EPA 6010C 2007

6. ORGANISMI MARINI

Nella prima parte saranno discusse le metodologie analitiche per la determinazione delle sostanze riconducibili ai composti organici e nella seconda saranno esaminate le procedure analitiche relative alla determinazione dei Metalli.

6.1 Composti organici

A cura di Antonella Ausili, Giulio Sesta

Per la matrice organismi marini sono stati individuati i seguenti raggruppamenti delle sostanze:

- Esaclorobutadiene (HCDB)
- Esaclorobenzene (HCB)
- Fluorantene e Benzo(a)Pirene
- PBDE
- DDT totale

Per ogni raggruppamento di sostanze sono presentati i risultati relativi alle prestazioni analitiche delle metodologie impiegate dalle Agenzie.

6.1.1 Esaclorobutadiene (HCBD)

La determinazione dell'esaclorobutadiene (HCBD) viene eseguita da sette Agenzie e tutte raggiungono il LOQ idoneo. Le altre sei Agenzie non eseguono l'analisi (Figura 20).

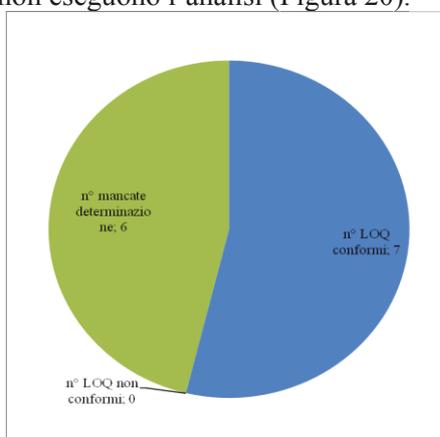


Figura 20. Conformità del LOQ richiesto per Esaclorobutadiene (HCBD) negli organismi marini.

Le tecniche di estrazione impiegate prevedono sia estrazioni solido-liquido (ultrasuoni, EPA 3550 e ASE, EPA 3545), sia spazio di testa statico (EPA 5021). Un'Agenzia dichiara un LOQ ma non la metodologia impiegata (Tabella 34).

Tabella 34. LOQ raggiunti per Esaclorobutadiene (HCBD) negli organismi marini e metodologie analitiche utilizzate.

Sostanza	SQA µg/kg	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
HCBD	55	5			0.1		10			1	1.5		10	0.05
		EPA 5021A + ECD			?		?			EPA 5021A + 8260	EPA 5021A + 8260		EPA 3545C + 3640A + 8270D	EPA 3550B + 3640A + 8270D

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

6.1.2 Esaclorobenzene (HCB)

La determinazione dell'esaclorobenzene (HCB) è eseguita da dieci Agenzie, di queste nove non presentano problemi nel raggiungere il LOQ (Figura 21). Un'unica Agenzia non raggiunge la sensibilità richiesta e impiega una metodologia con estrazione per spazio di testa (Tabella 35). Le Agenzie conformi che dichiarano la metodica impiegata utilizzano estrazioni solido-liquido. Tre Agenzie non eseguono l'analisi dell'HCB nel biota.

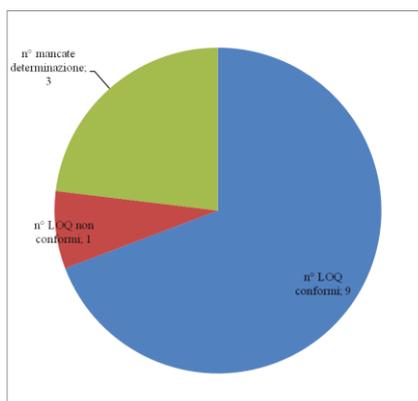


Figura 21. Conformità del LOQ richiesto per Esaclorobenzene (HCB) negli organismi marini.

Tabella 35. LOQ raggiunti per Esaclorobenzene (HCB) negli organismi marini e metodologie analitiche utilizzate.

Sostanza	SQA µg/kg p.u.	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
HCB	10	5		0.5	0.1	0.5	0.3			1	3	1	0.1	0.05
		5021a+ ECD		ICRAM	ICRAM	quechers+SPME-GC/MS	?			EPA 3545-3640a-8270d	?	EPA 3545 + 3640 + 8270C	EPA 3545C + 3640A + 8270D	EPA 3550B + 3640A + 8270D

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

6.1.3 Fluorantene e Benzo [a] pirene

Le Agenzie che determinano il fluorantene e il benzo [a] pirene nel biota sono nove, e tutte raggiungono il LOQ richiesto per il fluorantene (Tabella 36).

Il benzo [a] pirene presenta un valore di SQA inferiore rispetto al fluorantene, per cui tre Agenzie eseguono la determinazione con una sensibilità insufficiente mentre le restanti sei raggiungono il LOQ previsto (Figura 22).

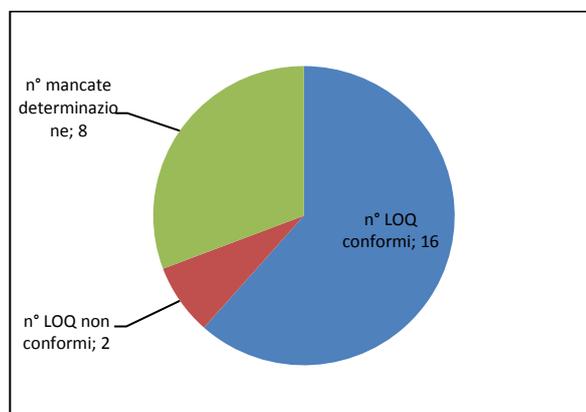


Figura 22. Conformità del LOQ richiesto per gli IPA negli organismi marini.

Tabella 36. LOQ raggiunti per gli IPA negli organismi marini e metodologie analitiche utilizzate.

Sostanza	SQA µg/kg p.u.	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
Benzo[a] Pirene	5				0,5	1	0,6	0,9	0,5	5	1,5	5		1
Fluorantene	30				0,5	1	0,6	0,9	0,5	5	9	5		1
					US+SiO ₂ +GC/MS	Quechers+HPLC	?	Quechers+HPLC	EPA 3545 + 3640 + 8270C	EPA 3545-3640a-8270d	EPA 3545 + 3640 + APAT 5080C HPLC	EPA 3545 + EPA 3640 + EPA 8270C		Quechers + HPLC

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

Per quanto riguarda le metodologie analitiche utilizzate, per l'estrazione sono impiegate diverse tecniche, due Agenzie utilizzano quechers, una ultrasuoni e quattro l'ASE, mentre per la determinazione strumentale tre Agenzie utilizzano l'HPLC e quattro la GC/MS. Una Agenzia non dichiara la metodologia impiegata.

6.1.4 Polibromodifeniletero (PBDE)

La determinazione del Polibromodifeniletero (PBDE) nel biota non è eseguita da otto Agenzie su tredici (Figura 23).

Il valore di SQA è particolarmente basso e, delle cinque Agenzie che eseguono la determinazione, solo una raggiunge una sensibilità analitica adeguata al requisito normativo, impiegando, per la analisi strumentale la spettrometria di massa ad alta risoluzione (Tabella 37).

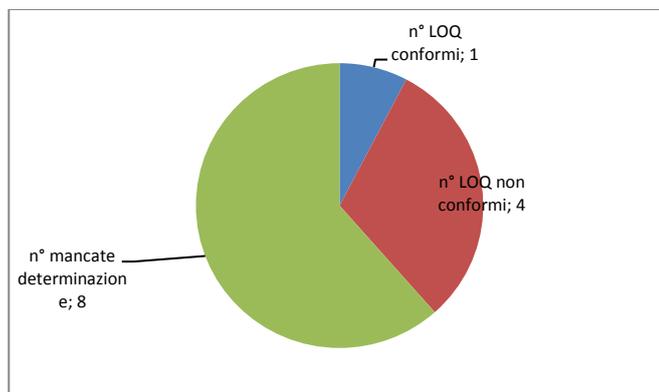


Figura 23. Conformità del LOQ richiesto per il Polibromodifeniletero (PBDE) negli organismi marini.

Tabella 37. LOQ raggiunti per il Polibromodifeniletero (PBDE) negli organismi marini e metodologie analitiche utilizzate.

Sostanza	SQA µg/kg p.u.	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
PBDE	0.0085						0.003			0.000001	0.01	5		0.004 (LB)
										EPA 1614		EPA 3545 + 3640 + 8270C		EPA 1614A 2010

In rosso i LOQ non conformi al requisito normativo ($\leq 30\%$ dello SQA).

6.1.5 DDT totale

Per il DDT totale (sommatoria di 4 composti) negli organismi marini non sono disponibili informazioni da parte delle Agenzie. Gli SQA fissati per questo parametro sono 50 e 100 µg/kg p.u. a seconda del contenuto lipidico della specie ittica (rispettivamente inferiore e superiore al 5%).

Considerando che i 4 composti del parametro in questione sono determinabili in maniera analoga al parametro HCB (perlomeno impiegando le tecniche di estrazione solido-liquido) e che per quest'ultimo parametro la maggioranza delle Agenzie non ha mostrato criticità nel conformarsi al relativo LOQ (che è un quinto di quello del DDT totale) si ritiene plausibile che le Agenzie non dovrebbero avere particolari difficoltà nell'eseguire con successo la determinazione anche del DDT totale nel biota.

6.2 Metalli

A cura di Maria Teresa Berducci, Chiara Maggi

Il Decreto Ministeriale 260/2010 e il D.lgs. 172/2015 hanno definito per i metalli lo SQA negli organismi marini solamente relativamente all'elemento mercurio.

In Tabella 38 vengono riportati il valore di SQA e il limite di quantificazione (LOQ) richiesti per la determinazione del Mercurio, riferiti al peso umido del campione.

Tabella 38. SQA e LOQ richiesti per il mercurio negli organismi marini.

Sostanza	SQA ($\mu\text{g}/\text{kg s.s.}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg s.s.}$)
mercurio	20	6

In Tabella 39 si riportano i LOQ dichiarati dalle varie Agenzie per la determinazione del mercurio negli organismi marini.

Tabella 39. LOQ raggiunti per il mercurio negli organismi marini.

Sostanza	SQA $\mu\text{g}/\text{kg}$	LOQ $\mu\text{g}/\text{kg}$	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
mercurio	20	6		3	4	2	3		< 5	6	20	6	5		20

Non emergono criticità particolari nella determinazione del Mercurio negli organismi marini; solamente due Agenzie non raggiungono il LOQ sebbene le metodologie adoperate per la determinazione siano idonee in termini di sensibilità (Figura 24).

Le metodiche riportate riguardano essenzialmente una mineralizzazione con soluzione acida, seguita dalla determinazione strumentale con assorbimento atomico con vapori freddi (CV-AAS), o spettrometria di emissione con plasma induttivamente accoppiato e spettrometria di massa (ICP-MS), ed anche determinazione del mercurio totale con analizzatore diretto (DMA-80) (Tabella 37).

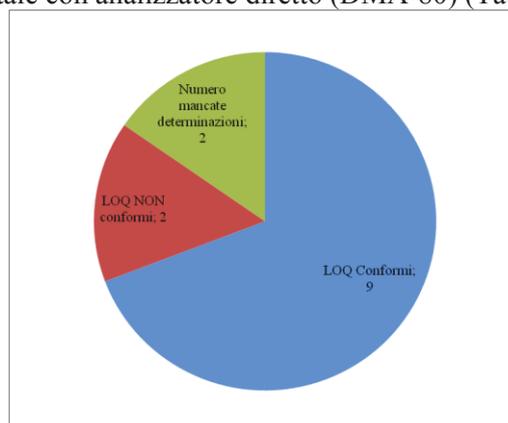


Figura 24. Conformità del LOQ richiesto per il mercurio negli organismi marini.

Tabella 40. Metodologie analitiche impiegate per la determinazione del mercurio e suoi composti negli organismi marini.

Sostanza	ABR	CAL	CAM	EMR	FVG	LAZ	LIG	MAR	PUG	SAR	SIC	TOS	VEN
mercurio e composti													
	MATTM- ICRAM Metodologie analitiche di riferimento 2001- + EPA 7474 2007			UNIEN ISO 17294-2:2005 (ICP/MS)	UNI EN 13805+UNI EN 13806	EPA 3051A + APAT 3200 (2003)	EPA 3050B + APAT 3200	MATTM- ICRAM Metodologie analitiche di riferimento 2001+APAT 3200(2003)	EPA 7473	MATTM- ICRAM Metodologie analitiche di riferimento 2001+ APAT 3200 (2003)	EPA 7473	EPA 7473	EPA 3052 + UNIEN ISO 17294-2:2005

7. CIRCUITI DI INTERCALIBRAZIONE

Nella fase di raccolta di informazioni relative alle metodiche analitiche utilizzate dalle Agenzie per la determinazione delle sostanze prioritarie nelle tre matrici marine è stata richiesta l'eventuale partecipazione a circuiti di intercalibrazione nazionali o internazionali.

7.1 Acque marine

Dal questionario relativo alle metodologie analitiche utilizzate dalle Agenzie per la determinazione di sostanze prioritarie nelle acque marine è emerso che solo cinque Agenzie, in funzione dei diversi parametri ricercati, hanno partecipato a diversi circuiti di intercalibrazione, ma nessuno specifico per le acque marine (Tabella 41).

Tabella 41. Partecipazione ai circuiti di intercalibrazione per le acque.

Agenzie / sostanza	fitosanitari	pesticidi organo fosforati	IPA	metalli	pesticidi clorurati	solventi organici	fenoli	ftalati
ARPA FVG	IC 027 ISPRA	IC 027 ISPRA	IC 027 ISPRA	IC 021 ISPRA				
ARPA Lazio	circuito acque potabili/scarico	circuito acque potabili/scarico			circuito acque potabili/scarico	circuito acque potabili/scarico		
ARPAL			FAPAS	IELAB				
ARPAE			UNICHIM e Acquacheck			UNICHIM e Acquacheck		
ARTA			circuito acque dolci				UNICHIM e Acquacheck	UNICHIM e Acquacheck
ARPAV	LGC	LGC	IFA	UNICHI M/IFA	LGC	UNICHIM	BIPEA	

7.2 Sedimenti

Nel caso della determinazione di sostanze prioritarie nella matrice sedimento, in funzione dei diversi parametri ricercati, n. 7 Agenzie hanno partecipato a diversi circuiti di intercalibrazione, solo in alcuni casi specifici per i sedimenti marini (Tabella 42).

Tabella 42. Partecipazione ai circuiti di intercalibrazione per i sedimenti.

Agenzie/sostanza	PCB	diossine	IPA	metalli	Hg
ARPA FVG	CIND, UNICHIM	CIND, UNICHIM	IC024 ISPRA	IC019 ISPRA	
ARPA Lazio	circuito per sedimenti		circuito per sedimenti	circuito per sedimenti	
ARPAC	circuito per sedimenti	circuito per sedimenti	UNICHIM	UNICHIM	
ARPAE	UNICHIM	UNICHIM	UNICHIM	UNICHIM e IAEA	
ARPAM				circuito per sedimenti	UNICHIM Meta/ISPRA

ARPAS	UNICHIM (matrice solida) + ISPRA (sedimenti marini)				
ARTA				circuito per sedimenti	
ARPAV	CIND/UNICHIM	CIND/UNICHIM	UNICHIM	UNICHIM	UNICHIM



**FRONTESPIZIO FINALE
FORNITO
DALL'UFFICIO GRAFICA**

**LINEE GUIDA SULLE ANALISI DI SOSTANZE
PRIORITARIE IN MATRICI MARINE
Idrocarburi Policiclici Aromatici e Metalli**

Informazioni legali

Il Consiglio Federale, istituito presso l'ISPRA con il compito di promuovere lo sviluppo coordinato del Sistema Agenziale (ISPRA/ARPA/APPA) nonché per garantire omogeneità nello svolgimento dei compiti istituzionali delle Agenzie e di ISPRA stessa, ha deciso con Delibera del 29 maggio 2012 di contraddistinguere i prodotti editoriali e le iniziative frutto delle attività congiunte a carattere nazionale dell'ISPRA e delle Agenzie ambientali, con la denominazione Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente e un nuovo logo rappresentativo.

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), le Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA), le Agenzie Provinciali per la Protezione dell'Ambiente (APPA) e le persone che agiscono per loro conto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.gov.it

ISPRA, Manuali e Linee Guida **/2017
ISBN *****

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

ISPRA

Grafica di copertina:

Foto di copertina:

Coordinamento pubblicazione on-line:

Daria Mazzella

ISPRA – Area Comunicazione

(inserire data)

Times 11 pt, bold

Coordinatore Gruppo di Lavoro:

Antonella Ausili (ISPRA)

Gruppo di Lavoro:

Maria Teresa Berducci, Daniela Berto, Chiara Maggi, Elena Romano, Giulio Sesta (ISPRA)

Domenica Ventrice (ARPA Calabria)

Maria Grazia Aquila, Carmen Ventimiglia (ARPA Campania)

Paola Martini (ARPA Emilia Romagna)

Massimo Celio, Jari Falomo (ARPA Friuli Venezia Giulia)

Laura Aguzzi, Mirco Leoni (ARPA Lazio)

Sonia Albanese, Christian Tiberiade (ARPA Liguria)

Manuela Ercolessi (ARPA Marche)

Lucia Mura (ARPA Sardegna)

Fabio Caporale (ARTA Abruzzo)

Citare questo documento come segue:

Ausili A. & Gruppo di Lavoro SNPA, 2017. Analisi di sostanze prioritarie in matrici marine. Idrocarburi Policiclici Aromatici e Metalli. ISPRA-SNPA – Manuali e Linee Guida xx/2017. Roma, xx 2017.

INDICE

1.	PREMESSA	6
2.	IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA)	8
2.1	Determinazione di IPA in acque marine	8
2.1.1	<i>Ricognizione metodologie ufficiali esistenti</i>	8
2.1.2	<i>Ricognizione delle prestazioni delle metodiche impiegate dalle Agenzie</i>	9
2.1.3	<i>Principio del metodo</i>	9
2.1.4	<i>Campo di applicazione</i>	10
2.1.5	<i>Campionamento e conservazione del campione</i>	10
2.1.6	<i>Interferenze e cause di errore</i>	10
2.1.7	<i>Estrazione del campione</i>	11
2.1.8	<i>Determinazione strumentale</i>	15
2.1.9	<i>Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati</i>	19
2.2	Determinazione di IPA nei sedimenti marini.....	21
2.2.1	<i>Ricognizione metodologie ufficiali esistenti</i>	21
2.2.2	<i>Ricognizione delle prestazioni delle metodiche impiegate dalle Agenzie</i>	21
2.2.3	<i>Principio del metodo</i>	22
2.2.4	<i>Campionamento e conservazione del campione</i>	22
2.2.5	<i>Interferenze e cause di errore</i>	22
2.2.6	<i>Estrazione e purificazione</i>	23
2.2.7	<i>Determinazione strumentale</i>	25
2.2.8	<i>Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati</i>	27
2.3	Determinazione di IPA in organismi marini	29
2.3.1	<i>Ricognizione metodologie ufficiali esistenti</i>	29
2.3.2	<i>Ricognizione delle prestazioni delle metodiche impiegate dalle Agenzie</i>	29
2.3.3	<i>Principio del metodo</i>	30
2.3.4	<i>Campionamento e conservazione del campione</i>	30
2.3.5	<i>Interferenze e cause di errore</i>	30
2.3.6	<i>Estrazione e purificazione</i>	31
2.3.7	<i>Determinazione strumentale</i>	33
2.3.8	<i>Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati</i>	35
3.	METALLI	37
3.1	Determinazione metalli in acque marine	37
3.1.1	<i>Ricognizione metodologie ufficiali esistenti</i>	37
3.1.2	<i>Metodologia per la determinazione di Cd, Ni, Pb e Hg con ICP-MS</i>	38
3.1.3	<i>Metodologia per la determinazione di Hg con CV-AFS</i>	42
3.1.4	<i>Metodologia per la determinazione del Hg con CV-AAS</i>	44
3.2	Determinazione dei metalli nei sedimenti marini	47
3.2.1	<i>Ricognizione metodologie ufficiali esistenti</i>	47
3.2.2	<i>Ricognizione delle prestazioni delle metodiche impiegate dalle Agenzie</i>	49
3.2.3	<i>Metodologia per il pretrattamento del campione</i>	49
3.2.4	<i>Determinazione di As, Cd, Cr tot, Pb, Ni e Hg nella soluzione mineralizzata</i>	50
3.2.5	<i>Determinazione di As, Cd, Cr, Ni e Pb con GF-AAS</i>	50
3.2.6	<i>Determinazione di As, Cr, Cd, Ni e Pb con ICP-OES</i>	52
3.2.7	<i>Determinazione di As, Cd, Cr, Hg, Ni e Pb con ICP-MS</i>	55
3.2.8	<i>Determinazione di Cr (VI)</i>	58
3.2.9	<i>Determinazione spettrofotometrica del Cr (VI)</i>	60
3.2.10	<i>Determinazione del Cr (VI) con cromatografia ionica</i>	61
3.2.11	<i>Determinazione strumentale di Hg</i>	63

3.2.12	<i>Determinazione di Hg con CV-AAS</i>	63
3.2.13	<i>Determinazione di Hg con CV-AFS</i>	65
3.2.14	<i>Determinazione di Hg con DMA-80</i>	67
3.3	Determinazione metalli in organismi marini	70
3.3.1	<i>Ricognizione metodologie ufficiali esistenti</i>	70
3.3.2	<i>Ricognizione delle prestazioni delle metodiche impiegate dalle Agenzie</i>	71
3.3.3	<i>Metodologia per il pretrattamento del campione</i>	71
3.3.4	<i>Principio del metodo</i>	71
3.3.5	<i>Campionamento e conservazione del campione</i>	71
3.3.6	<i>Interferenze e cause di errore</i>	72
3.3.7	<i>Determinazione di Hg con CV-AAS</i>	72
3.3.8	<i>Determinazione di Hg con CV-AFS</i>	74
3.3.9	<i>Determinazione di Hg con ICP-MS</i>	76
3.3.10	<i>Determinazione di Hg con DMA-80</i>	78
4.	BIBLIOGRAFIA	81

1. PREMESSA

Il presente volume *Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine - Idrocarburi policiclici aromatici e Metalli* costituisce il primo dei documenti intermedi che compongono le *Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine* risultato dalle attività condotte dal Gruppo di Lavoro n. 4 dell'Area 1 "Formazione del dato" previsto all'interno del programma triennale 2014-2016 del Sistema Nazionale di Protezione dell'Ambiente (SNPA).

Questa Linea Guida ha come obiettivo quello di fornire metodologie, aggiornate e condivise da SNPA, per l'analisi chimica delle sostanze appartenenti all'elenco di priorità, a disposizione di tutti i soggetti pubblici e privati che per varie ragioni devono eseguire tali determinazioni in matrici ambientali marine.

In considerazione dell'elevato numero di sostanze prese in considerazione e delle diverse matrici interessate, nonché delle criticità evidenziate per la determinazione di alcune classi di queste sostanze per le quali solo poche Agenzie riescono a raggiungere i requisiti di qualità richiesti dalle direttive europee, in particolare dall'ultimo D.lgs. n. 172 del 13 ottobre 2015, si è ritenuto più pratico produrre una serie di documenti divisi per classi di sostanze.

Questa Linea guida riguarda la determinazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e dei metalli nelle diverse matrici: acque superficiali, sedimenti e organismi marini e segue il volume "*Verifica delle metodologie ufficiali esistenti e la loro applicabilità alle matrici marine*" che contiene una ricognizione generale delle prestazioni delle metodologie analitiche utilizzate dalle Agenzie impegnate nelle indagini delle aree marino-costiere per la determinazione delle sostanze prioritarie nelle diverse matrici.

In questa Linea guida sono descritte metodologie analitiche impiegabili nel monitoraggio chimico delle tre matrici marine, acque, sedimenti e biota, per gli analiti previsti dal D.lgs. 172/2015, riconducibili ai gruppi degli IPA e dei metalli. Le metodologie descritte derivano da quelle effettivamente adottate dalle Agenzie per il monitoraggio chimico delle matrici marine così come prescritto dalla normativa nazionale che recepisce la direttiva quadro sulle acque e le sue successive modifiche.

Nella scelta delle metodologie impiegabili si è tenuto conto sia di criteri legati alla capacità delle tecniche di soddisfare le prestazioni analitiche richieste dalla normativa sia di criteri legati alla diffusione reale di tecniche e strumentazioni nei laboratori. Per ogni matrice e per ogni analita o classe di analiti sono descritte le possibili tecniche impiegabili, discutendone limiti e accorgimenti da adottare. La scelta della tecnica o della combinazione di tecniche da adottare è lasciata al laboratorio che deve tuttavia verificare e dimostrare l'idoneità allo scopo, in particolare in termini di sensibilità analitica in matrice.

Elenco delle sigle utilizzate

CV-AAS	Spettrometria di Assorbimento Atomico a Vapori Freddi
CV-AFS	Spettrometria di Fluorescenza Atomica
DMA-80	Analizzatore Diretto di Mercurio
GC	Gascromatografia
GC/MS	Gascromatografia accoppiata a Spettrometria di Massa
GC/MS/MS	Gascromatografia accoppiata a Spettrometria di Massa tandem
GdL	Gruppo di Lavoro
GF-AAS	Spettrofotometria a Assorbimento Atomico con Fornetto di Grafite
GPC	Cromatografia di Gel Permeazione
HPLC	Cromatografia Liquida a Alta Prestazione
HPLC/FLD	Cromatografia Liquida a Alta Prestazione con Rivelatore a Fluorescenza
ICP-MS	Spettrometria di Massa a Plasma accoppiato induttivamente a Spettrometria di Massa
ICP-OES	Spettrometria di Emissione Atomica mediante Plasma Induttivamente Accoppiato
LOQ	Limit of Quantification
LVI	Large Volume Injection
MRM	Multiple Reaction Monitoring
PDA	Rivelatore a serie di diodi
PLE	Estrazione a Liquido Pressurizzato
PTFE	Politetrafluoroetilene
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SDVB	Stirene DiVinil Benzene
SIM	Selected Ion Monitoring
SNPA	Sistema Nazionale di Protezione dell'Ambiente
SPDE	Estrazione in fase Solida su Disco
SPE	Estrazione in fase Solida
SPME	Estrazione in fase Solida su Microfibra
SQA	Standard di Qualità Ambientale
SQA-CMA	Standard di Qualità Ambientale - Concentrazione Massima Ammissibile

2. IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA)

A cura di Giulio Sesta

2.1 Determinazione di IPA in acque marine

Il monitoraggio chimico delle acque marine comporta l'esecuzione di un elevato numero di analisi (una per ogni analita o classe di analiti) su un elevato numero di aliquote di campione. Il volume di lavoro generato per i laboratori è di conseguenza molto elevato e potrebbe essere sensibilmente ridotto dall'impiego di una metodologia analitica multicomponente che consenta un unico procedimento di estrazione/purificazione su di un'unica aliquota di campione e un unico procedimento per la determinazione strumentale (o eventualmente due nel caso di estratti destinati all'analisi GC e HPLC).

In quest'ottica, le tecniche di determinazione strumentale utilizzabili sono esclusivamente quelle altamente selettive e, nel caso di molti analiti, quelle più sensibili, come la spettrometria di massa tandem o a alta risoluzione.

L'impiego di metodi multicomponente è probabilmente la via più auspicabile per il raggiungimento della conformità del monitoraggio chimico ai requisiti di prestazione analitica della normativa. Questo, tuttavia, richiede un certo livello di investimento economico e implica la riorganizzazione logistica dei laboratori che potrebbe portare a un ristretto numero di siti specializzati e attrezzati.

La situazione ipotizzata è chiaramente ancora in evoluzione, per cui in questa Linea Guida la descrizione che segue non riguarda lo sviluppo di una metodologia multicomponente, ma la discussione riguardo le diverse metodologie impiegabili per la determinazione della sola classe degli IPA.

Le difficoltà analitiche nella determinazione degli IPA nelle acque marine sono determinate dai valori di SQA particolarmente bassi che la normativa ambientale vigente, in particolare il D.lgs. 172/2015 (2013/39/EU) ha introdotto per alcuni di essi (Tabella 1).

In alcuni casi, è richiesto il raggiungimento di LOQ che si avvicinano molto o vanno oltre le possibilità delle tecniche di determinazione strumentale tradizionalmente impiegate per questo tipo di analiti (GC/MS e HPLC/FLD).

Tabella 1. SQA e LOQ richiesti per la determinazione degli IPA per le acque marine.

IPA	SQA ($\mu\text{g/l}$)	LOQ * ($\mu\text{g/l}$)
Antracene	0.1	0.03
Benzo [a] pirene	0.00017	0.00005
Benzo [b] fluorantene	0.017 CMA	0.005
Benzo [k] fluorantene	0.017 CMA	0.005
Benzo [g,h,i] perilene	0.00082 CMA	0.00025
Fluorantene	0.0063	0.002
Naftalene	2	0.6

* Limite di quantificazione ai sensi del D.lgs. 219/2010 (2009/90/CE e 2008/105/CE).

2.1.1 Ricognizione metodologie ufficiali esistenti

Per alcuni analiti, in particolare il benzo [a] pirene e il fluorantene, oltre al benzo [g,h,i] perilene per il quale però è stato fissato lo SQA solo come concentrazione massima ammissibile (CMA), le metodologie ufficiali esistenti, sia europee sia statunitensi, non consentono il pieno raggiungimento della prestazione analitica richiesta (Tabella 2).

Solo il metodo più recente (EN 16691:2015), preparato dalla Commissione Tecnica CEN/TC 230 "Water analysis", su mandato della Commissione Europea per soddisfare i requisiti analitici previsti dalla Direttiva 2008/105/CE, consente di avvicinarsi ai LOQ richiesti dalla 2013/39/EU per benzo [a] pirene e fluorantene, ma non consente il pieno raggiungimento del LOQ richiesto per benzo [a] pirene.

Tabella 2. Metodologie ufficiali nazionali e internazionali per la determinazione di IPA in acque marine.

Metodo	LOQ ($\mu\text{g/l}$)	Determinazione strumentale
IRSA-CNR-APAT 5080	0.005	(GC/MS o HPLC/FLD)
EN 16691:2015	B [a] P = 0.00033 - Flt=0.0021	(GC/MS)
EPA 525.3 2012	B [a] P = 0.006	(GC/MS SIM)
ISO 28581:2012 (rev. 2015)	> 0.01	(GC/MS)
ISO 28540:2011	> 0.01	(GC/MS)
ISO 7981-2:2005 (rev. 2014)	> 0.005	(estrazione L-L, HPLC/FLD)
ISO 17993:2002 (rev. 2013)	> 0.01	(HPLC/FLD)

B [a] P = benzo [a] pirene; Flt = fluorantene.

2.1.2 Ricognizione delle prestazioni delle metodiche impiegate dalle Agenzie

Sulla base dei dati raccolti dal Gruppo di Lavoro 4 del SNPA, come riportato nel volume “Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine - Verifica delle metodologie ufficiali esistenti e la loro applicabilità alle matrici marine”, è stato possibile avere un quadro completo delle metodologie impiegate dalle varie Agenzie e dei relativi limiti di quantificazione.

I nuovi SQA introdotti dal D.lgs. 172/2015 hanno determinato un abbassamento dei LOQ e di conseguenza hanno comportato l’adeguamento delle metodologie analitiche da parte di molte Agenzie. In base ai dati aggiornati a marzo 2017 vi sono n. 67 conformità al LOQ e n. 24 non conformità, queste ultime si riferiscono principalmente agli analiti che presentano gli SQA più bassi.

Solo cinque Agenzie riescono a raggiungere la conformità per tutti gli analiti, in particolare del benzo [a] pirene. Tre di queste impiegano come tecnica di determinazione strumentale la gascromatografia, GC/MS/MS (in triplo quadrupolo) e una impiega la cromatografia liquida, l’HPLC/FLD con un rivelatore fluorimetrico particolarmente sensibile. Le restanti Agenzie che non riescono a raggiungere il LOQ per il benzo [a] pirene, sebbene un’Agenzia ci arrivi molto vicino, impiegano la GC/MS (non tandem) o l’HPLC/FLD.

Dalla ricognizione delle metodiche impiegate dalle Agenzie, è emerso che le tecniche di estrazione del campione di acqua e i fattori di concentrazione (rapporto fra volume del campione e volume finale dell’estratto) sono diversi tra loro, anche fra quelli conformi al LOQ. Gli aspetti legati alla estrazione e concentrazione del campione quindi non risultano determinanti ai fini del raggiungimento della conformità al LOQ. Il fattore più importante risulta la sensibilità analitica della tecnica di determinazione strumentale impiegata.

In generale, per la determinazione degli IPA nelle acque marine è possibile proporre per gli analiti con SQA non particolarmente bassi, come naftalene, antracene, benzo [b] fluorantene, benzo [k] fluorantene e indeno [1,2,3-cd] pirene, diverse alternative strumentali, mentre per analiti più problematici quali benzo [a] pirene e, in alcuni casi, fluorantene e benzo [g,h,i] perilene, si deve ricorrere a tecniche strumentali più sensibili, come la GC/MS/MS o l’HPLC accoppiata a un rivelatore a fluorescenza di particolare sensibilità.

Sulla base delle metodologie standardizzate esistenti e delle metodologie impiegate e fornite dalle Agenzie, si riportano nei paragrafi successivi i dettagli dei procedimenti analitici applicabili per la determinazione degli IPA in acque marine.

2.1.3 Principio del metodo

Il campione di acqua marina tal quale, conservato in frigorifero per non più di sette giorni dal momento del campionamento (ISO 5667-3:2003 e EPA SW-846:2007), è fortificato con standard interni (determinazione GC/MS o GC/MS/MS) o surrogati (determinazione in HPLC/FLD) e sottoposto a estrazione secondo diverse modalità (estrazione liquido-liquido in imbuto separatore o in bottiglia mediante agitatore a vortice, estrazione su fase solida su disco o su cartuccia, SBSE (*Stir Bar Sorptive Extraction*)).

L'estratto viene concentrato, e eventualmente purificato, per cromatografia di adsorbimento su gel di silice, portato a volume finale in un solvente idoneo all'iniezione strumentale, addizionato di standard di siringa o standard interno di iniezione (nel caso di determinazione GC/MS o GC/MS/MS) e quindi avviato all'analisi strumentale. Per la determinazione del naftalene, a causa della sua elevata volatilità, è auspicabile l'impiego di una metodologia specifica per analiti volatili (*purge and trap*, SPME, ecc.).

2.1.4 Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione degli IPA in campioni di acqua marina in un intervallo di concentrazioni dipendente in gran parte dalla tecnica di determinazione strumentale impiegata e comunque specifico di ciascun laboratorio che esegue l'analisi. La tabella 3 riporta, a titolo esemplificativo, i LOQ raggiungibili con tecniche GC/MS, GC/MS/MS e HPLC/FLD e rivelatore particolarmente sensibile.

Tabella 3. Metodologie ufficiali nazionali e internazionali per la determinazione di IPA in acque marine.

IPA	LOQ GC/MS* (µg/l)	LOQ GC/MS/MS** (µg/l)	LOQ HPLC/FLD*** (µg/l)
Antracene	0.00024	0.0001	0.0001
Benzo [a] pirene	0.00033	0.00005	0.00005
Benzo [b] fluorantene	0.00056	0.0001	0.0001
Benzo [k] fluorantene	0.00044	0.0001	0.0001
Benzo [g,h,i] perilene	0.00044	0.0001	0.0001
Indeno [1,2,3-cd] pirene	0.00042	0.0001	0.0001
Fluorantene	0.0021	0.0001	0.0001
Naftalene		0.001	0.0001

* LOQ riportati da EN 16691:2015; ** LOQ dichiarati da ARPA FVG; *** LOQ dichiarati da ARPAL.

2.1.5 Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento deve essere effettuato in bottiglie di vetro della capacità 1-2 l. Le bottiglie devono essere in vetro scuro o rivestite di un foglio di alluminio in modo da preservare gli analiti fotolabili. Le bottiglie e i tappi (preferibilmente dotati di rivestimento interno in teflon) devono essere prima dell'uso risciacquati con acetone e asciugati. I campioni vanno conservati al buio e in frigorifero a +4°C. Le operazioni di estrazione devono essere effettuate il più presto possibile e comunque non oltre 7 giorni dalla data del campionamento.

2.1.6 Interferenze e cause di errore

È necessario verificare che i reagenti, i consumabili, la vetreria, le apparecchiature e la strumentazione impiegati non apportino interferenze nella determinazione degli analiti. Tale verifica deve essere effettuata al primo impiego dei suddetti materiali e durante tutto il periodo del loro utilizzo, inserendo l'analisi di bianchi di procedimento a ogni sequenza di estrazione. È della massima importanza selezionare solventi di elevata purezza e verificare che non apportino, in particolare dopo la loro concentrazione, interferenze significative nella determinazione.

Il sodio solfato e la silice, se utilizzata, devono essere purificati in muffola a 600°C per una notte e quindi conservati in essiccatore prima del loro utilizzo.

È preferibile evitare l'uso di tubi di gomma o silicone e comunque di plastiche diverse dal PoliTetraFluoroEtilene (PTFE), come anche impiegare filtri in fibra di vetro o di acciaio invece che in cellulosa.

È necessario assicurare che il campione e in particolare l'estratto in solvente organico siano mantenuti al riparo dalla luce solare diretta allo scopo di evitare la fotodegradazione di alcuni analiti sensibili. In tal senso può essere utile l'impiego di vetreria ambrata e di fogli di alluminio.

Le interferenze cromatografiche devono essere attentamente valutate e le condizioni operative del rivelatore devono essere scelte in modo da massimizzare la selettività per l'analita ricercato (selezione ottimale delle lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione nel caso di determinazione in HPLC/FLD, selezione ottimale di ioni e/o transizioni, di energie di collisione e di *dwell time* nel caso di determinazione in GC/MS o GC/MS/MS).

Bisogna inoltre verificare che la risoluzione cromatografica di alcuni analiti con tempi di ritenzione vicini sia sufficiente per fornire un risultato come singolo analita ($R > 0.8$), o se non sia invece tale da dover riportare il risultato come somma di più analiti (ad esempio, in GC, la coppia fenantrene-antracene o il trio benzo [b] – benzo [j] – benzo [k] - fluorantene o l'interferenza sull'indeno [1,2,3-cd] pirene da parte del dibenzo [a,h] antracene o di altri composti).

2.1.7 Estrazione del campione

In linea di principio l'estrazione del campione di acqua marina può essere eseguita attraverso diverse tecniche: estrazione su fase solida su disco o su cartuccia, estrazione liquido-liquido in imbuto separatore, microestrazione, estrazione in fase solida (estrazione con ancorotta magnetica adsorbente, SBSE), ecc.

È determinante nella scelta della tecnica da impiegare e nelle condizioni operative selezionate, il raggiungimento dell'appropriato fattore di concentrazione (rapporto tra volume di campione di acqua da estrarre e volume finale dell'estratto sottoposto a determinazione strumentale). Considerati i LOQ richiesti per alcuni analiti, tale fattore di concentrazione non può essere inferiore a 1000, anche se per alcuni di essi potrebbe non essere sufficiente neanche questo valore, qualora non si impieghino tecniche strumentali particolarmente sensibili.

Tecniche estrattive che non consentono il raggiungimento di tale fattore di concentrazione, come ad esempio l'estrazione in fase solida (SPE) online o su microfibra (SPME), non sono generalmente in grado di garantire la sensibilità analitica richiesta per tutti gli analiti, e quindi possono essere applicate solo agli analiti meno impegnativi dal punto di vista del LOQ richiesto.

Considerato che il volume di campione di acqua di mare a disposizione, o comunque sottoponibile a estrazione è limitato, il volume finale dell'estratto è il parametro con maggiori possibilità di intervento. Tuttavia riducendo eccessivamente il volume finale dell'estratto aumenta la possibilità di perdita degli analiti più volatili, in particolare del naftalene, o di quelli meno stabili, come il benzo [a] pirene, quando è presente in basse concentrazioni.

Le condizioni di concentrazione dell'estratto, compresa la sostituzione del solvente con uno più idoneo per la determinazione cromatografica, devono essere ben controllate in modo da evitare l'eccessiva perdita degli analiti. In questo senso è essenziale l'impiego di standard interni che consentano di valutare il recupero analitico e eventualmente correggere i risultati. Un accorgimento utile a incrementare il fattore di concentrazione senza incorrere nei problemi legati a un'evaporazione molto spinta dell'estratto può essere, in gascromatografia, l'iniezione di grandi volumi (iniezione LVI o *solvent vent*).

In generale, le metodiche di determinazione strumentale che impiegano la spettrometria di massa consentono l'uso di standard interni marcati isotopicamente, in ragione di un composto marcato per ognuno degli analiti ricercati. Si raccomanda quindi questa pratica, senza tuttavia prescindere dal raggiungimento di un adeguato recupero analitico (preferibilmente compreso tra il 70% e il 110%, BS EN 16691:2015).

Nel caso in cui la determinazione strumentale sia effettuata mediante HPLC con rivelatore a fluorescenza, l'uso di standard interni marcati isotopicamente per ogni analita può essere possibile solamente in caso di effettiva capacità di risolvere cromatograficamente, nel tracciato della relativa lunghezza d'onda di emissione, lo standard marcato dall'analita nativo, o da altri picchi presenti nel cromatogramma. In questo caso, si raccomanda di impiegare tutti gli standard interni quantificabili con affidabilità e si segnala la possibilità di utilizzare, oltre che composti marcati col deuterio, anche IPA monofluorurati.

In generale, è preferibile procedere direttamente alla determinazione strumentale, senza la fase di purificazione, per non compromettere i recuperi e non rischiare di introdurre contaminazioni; qualora si

ritenga indispensabile una purificazione dell'estratto si raccomanda il *clean up* su colonne di silice purificata. Si consiglia di purificare la silice mantenendola per una notte in muffola a 600°C. La colonna di silice deve essere sormontata da uno strato di sodio solfato anidro, anch'esso purificato in muffola, ben condizionato in solvente, realizzando un impaccamento omogeneo e privo di bolle d'aria e cammini preferenziali. Il campione viene caricato in estratto apolare e gli IPA vengono eluiti con una miscela circa 1:1 di esano e diclorometano.

Qualunque sia la procedura di estrazione scelta, è responsabilità del laboratorio dimostrare inizialmente, e verificare durante l'applicazione, che essa, alle concentrazioni richieste dalla normativa vigente, consenta di raggiungere le prestazioni analitiche prescritte.

Esempi di condizioni operative di estrazione

Vengono di seguito riportati esempi di condizioni operative impiegabili per l'estrazione in fase solida (SPE) su cartuccia (metodo ARPAL), su disco (metodo EN 16691:2015), per l'estrazione liquido-liquido mediante imbuto separatore (metodo IRSA-CNR-APAT 5080), per l'estrazione liquido/liquido (metodi ARPA FVG e ARPA Lazio) e per la SBSE (metodo ARPAS).

Estrazione in fase solida su cartuccia: esempio di condizioni operative

A titolo di esempio, si riporta il procedimento impiegato da ARPAL per l'estrazione SPE del campione di acqua impiegando una cartuccia Isolute PAH 1.5 g/6 ml contenente sia l'adsorbente C18 sia l'adsorbente amminopropilico NH₂ dedicato alla ritenzione degli acidi umici. Al campione di acqua del volume di circa 1 litro si aggiunge alcool isopropilico in modo da realizzare una concentrazione del 10% v/v. Si omogeneizza agitando il contenuto della bottiglia e si lascia a riposo per circa 30 minuti.

Nel frattempo si procede al condizionamento delle colonnine Isolute PAH 1.5 g/6 ml. Si pone la cartuccia C18 sulla linea del vuoto condizionandola dapprima con 5 ml di isopropanolo e successivamente con 5 ml di acqua:isopropanolo 98:2 a un flusso di 5 ml/min avendo cura di non portare a secco la fase stazionaria. Si inizia quindi il caricamento del campione per aspirazione collegando, per mezzo di un tubo in teflon, la colonnina alla bottiglia. Si mantiene un flusso di circa 10 ml/min. Al termine del caricamento si lava la bottiglia con 10 ml di acetone per recuperare gli analiti adsorbiti sulle pareti, si diluisce quindi lo sciacquo organico 1 a 10 con acqua purificata e si carica sulla cartuccia.

Si eluiscono eventuali interferenti adsorbiti con 5 ml di una soluzione acqua:isopropanolo 90:10 e infine si porta a secco la fase stazionaria flussando per 5' azoto anidro in colonnina.

L'eluizione quantitativa viene infine ottenuta con 3 o più aliquote da 2 ml ciascuna di diclorometano. Al fine di agevolare il più possibile il desorbimento degli IPA, si consiglia di lasciare il diclorometano a contatto con la fase stazionaria per un paio di minuti. La procedura di estrazione può essere svolta in maniera automatizzata mediante l'utilizzo di apposita strumentazione dedicata all'estrazione in fase solida.

Ai fini della determinazione strumentale, in questo caso in HPLC/FLD, l'eluato viene portato a piccolo volume (circa 100 µl) e addizionato di acetonitrile fino a un volume finale di 1 ml. L'estratto così preparato viene filtrato in filtri per siringa in PTFE da 0.45 o 0.20 µm.

Estrazione in fase solida su disco SDVB: esempio di condizioni operative

Si riporta, come esempio, il procedimento descritto dalla BS EN 16691:2015.

Preliminarmente si registra il peso del campione comprensivo della sua bottiglia (accuratezza di 0.1 g) e si assicura che il pH del campione sia compreso tra 5 e 8, allo scopo di non degradare la fase stazionaria a base di silice.

Al campione, non filtrato, viene addizionata una quantità nota di standard interni contenuti in un solvente miscibile con acqua, ad esempio 100 ng di una miscela contenente gli analoghi perdeuterati degli analiti di interesse: antracene-d10, fluorantene-d10, benzo [b] fluorantene-d12, benzo [k] fluorantene-d12, benzo [a] pirene-d12, indeno [1,2,3-cd] pirene-d12 e benzo [g,h,i] perilene-d12.

Si installa il disco di estrazione di Stirene-DiVinilBenzene (SDVB) da 47 mm di diametro, sull'apparecchiatura da vuoto e si condiziona con 20 ml di diclorometano, lasciandolo a contatto per 1 minuto e eluendolo poi in 20 secondi. Evitando che la fase stazionaria vada a secco ripetere il condizionamento prima con 10 ml di acetone e poi con 10 ml di acqua purificata.

Si carica il campione di acqua a un flusso di circa 25 ml/min e si lava la bottiglia con acqua purificata, caricando anche quest'ultima sul disco. Si secca il disco sotto vuoto, per non più di 5 minuti, utilizzando azoto o aria essiccata.

Per l'eluizione degli analiti si inizia con 5 ml di acetone che si lasciano a contatto per 2 minuti e poi si eluiscono in 20 secondi. Si caricano prima 10 ml di diclorometano, si lasciano a contatto per 2 minuti e si eluiscono in 40 secondi, poi si caricano 5 ml di diclorometano e si lasciano a contatto per 1 minuto e per poi eluirli in 20 secondi. Quest'ultimo passaggio si ripete 4 volte. Si sciacqua la bottiglia con 15 ml di diclorometano e si passa attraverso il disco. L'eluato così raccolto viene disidratato per passaggio su sodio solfato anidro (circa 50 g) condizionato con diclorometano.

Il peso della bottiglia vuota, ben scolata, viene registrato (accuratezza di 0.1 g) e da esso viene quindi ricavato il peso del campione di acqua.

L'estratto viene quindi concentrato a 500 µl di esano e addizionato dello standard interno di iniezione o di siringa, ad esempio 10 µl di 1,2,3,4-tetracloro-naftalene 10 µg/ml, realizzando così una concentrazione di 200 ng/ml nell'estratto, così come nelle soluzioni di taratura.

Estrazione con imbuto separatore: esempio di condizioni operative

Come esempio si riporta il procedimento descritto dal metodo IRSA-CNR-APAT 5080.

Si trasferisce quantitativamente il campione di acqua in un imbuto separatore da 2 l e si risciacqua accuratamente la bottiglia con 50 ml di diclorometano. Sono aggiunti gli standard interni (ad esempio 100 ng di una miscela contenente gli analoghi perdeuterati degli analiti di interesse: antracene-d10, fluorantene-d10, benzo [b] fluorantene-d12, benzo [k] fluorantene-d12, benzo [a] pirene-d12, indeno [1,2,3-cd] pirene-d12 e benzo [g,h,i] perilene-d12) agitando per una accurata distribuzione.

Una volta aggiunto il solvente di estrazione, 50 ml di diclorometano, si agita vigorosamente per 2 minuti. Si lascia decantare e si trasferisce l'estratto ottenuto in un pallone da 250 ml. Si ripete l'estrazione altre due volte con uguali aliquote di solvente (50 - 60 ml), si riuniscono gli estratti e si aggiunge solfato di sodio anidro per anidrificare.

L'estratto organico è concentrato dapprima a un volume pari circa 5 ml, con evaporatore rotante (la temperatura del bagno termostatico non deve essere superiore a 40°C), poi a circa 1 ml, sotto flusso di azoto, quindi è trasferito quantitativamente in una fiala da 4 ml con diclorometano. Durante le fasi di concentrazione deve essere fatta attenzione a non far andare a secco l'estratto, per evitare la perdita degli IPA più volatili. Dopo aver concentrato l'estratto a circa 1 ml si può procedere alla purificazione, se necessaria.

Estrazione liquido-liquido: esempi di condizioni operative

Si riporta, come primo esempio, il procedimento impiegato da ARPA FVG.

L'estrazione degli analiti dall'acqua viene effettuata utilizzando un agitatore e un'ancoretta magnetica inserita direttamente nella bottiglia di campionamento da 1 l. Per permettere all'ancoretta magnetica di esercitare un'azione meccanica ottimale è necessario svuotare parzialmente la bottiglia, utilizzando la serigrafia presente su di essa, portando il volume di acqua a circa 800 ml. Per avere la quantità esatta di campione estratto, con una bilancia tecnica si pesa la bottiglia con il campione e alla fine della procedura si pesa la bottiglia vuota. Il rapporto tra peso teorico (800 g) e peso misurato viene utilizzato per correggere le concentrazioni quantificate.

La bottiglia viene posta sotto leggera agitazione magnetica, si aggiungono gli standard interni e si lascia omogeneizzare il tutto per almeno 5 minuti. Si aggiungono 10 ml di esano, si tappa la bottiglia e si pone in agitazione al massimo della velocità per 10 minuti. Dopo aver fermato l'agitazione si aggiunge acqua purificata per alzare il livello del liquido fino al collo della bottiglia e, con pipetta a puntale monouso, si

trasferiscono 5 ml della soluzione esanica surnatante nel *vial*. Sotto debole flusso di azoto si concentra a 0.5 ml e si addiziona lo standard di siringa.

Come ulteriore esempio di condizioni operative si riporta anche il procedimento di microestrazione impiegato da ARPA Lazio, basato sul metodo descritto nel Manuale CORILA 2007.

L'estrazione di un volume pari a 2 l del campione di acqua avviene in un pallone con collo a smeriglio e fondo piatto. Il tappo a smeriglio è modificato in quanto presenta un'appendice inferiore capace di disperdere finemente in microscopiche goccioline il vortice di solvente organico (5 ml di isoottano) generato dall'ancoretta magnetica. In tal modo si incrementa la superficie di contatto tra solvente e campione aumentando l'efficienza estrattiva.

Dopo 30 minuti di agitazione si attende la separazione delle fasi e si installa, al posto del tappo a smeriglio, l'apposito microestrattore. Questo è un articolo di vetreria dotato di raccordo a smeriglio e di due colli. Il primo collo serve per l'immissione di acqua purificata allo scopo di innalzare il livello del liquido nel pallone e portarlo all'interno del microestrattore, il secondo collo serve per il recupero quantitativo della fase organica (che deve avere densità inferiore a 1) mediante pipetta. L'estratto, eventualmente disidratato con sodio solfato anidro, viene quindi concentrato a 200 µl ottenendo un fattore di concentrazione pari a 10000.

SBSE: esempi di condizioni operative

La tecnica SBSE prevede l'impiego di un'ancoretta magnetica (detta *twister*) ricoperta di fase stazionaria liquida (generalmente dimetilpolisilossano, PDMS) in agitazione nel campione di acqua per un periodo sufficiente a raggiungere un equilibrio di ripartizione liquido-liquido degli analiti tra la fase acquosa e la fase stazionaria. L'ancoretta viene quindi inserita in uno specifico termodesorbitore installato come accessorio su un gascromatografo che trasferisce gli analiti nell'iniettore dove avviene una criofocalizzazione e quindi il trasferimento in colonna e l'analisi cromatografica.

La quantità di fase stazionaria sull'ancoretta *twister* è molto maggiore di quella disponibile per una fibra SPME e quindi la sensibilità della tecnica SBSE è molto maggiore di quella della tecnica SPME. Il recupero dal *twister* di analiti non eccessivamente apolari potrebbe essere effettuato anche mediante estrazione con acetonitrile (generalmente per eseguire la determinazione in HPLC) ma, per via dell'impossibilità di iniettare la totalità del solvente utilizzato per estrarre l'ancoretta, la sensibilità analitica complessiva non sarebbe sufficiente a raggiungere i requisiti di LOQ per gli analiti più impegnativi.

Si riporta, a titolo di esempio, il procedimento impiegato da ARPAS.

Un'aliquota di 100 ml di campione di acqua viene trasferita in beuta con fondo piatto e addizionata di 10 ml di metanolo e di 100 µl di miscela di standard interni a 2µg/l contenente gli analoghi deuterati degli analiti di interesse: acenafene-d10, benzo [a] antracene-d12, benzo [a] pirene-d14, dibenzo [a,h] antracene-d14, dibenzo [a,i] pirene-d14, fenantrene-d10, fluorantene-d10.

L'estrazione avviene mantenendo il *twister* in agitazione su piastra magnetica a 900 giri al minuto per almeno 10 ore.

Al termine si sciacqua il *twister* con acqua purificata, lo si asciuga con carta e lo si inserisce nel liner di desorbimento specifico per la *Thermal Desorption Unit* (TDU) della Gerstel. La TDU, alla temperatura iniziale di 36°C per 6 secondi, viene molto rapidamente riscaldata a 300°C per 8 minuti.

Durante il termodesorbimento del *twister* l'iniettore Gerstel CIS (*Cooled Injection System*) viene raffreddato a 20°C per mezzo di anidride carbonica liquida. Dopo la criofocalizzazione degli analiti nell'iniettore CIS questo viene riscaldato a 12°C/s fino a 310°C e così tenuto per 10 minuti per trasferire gli analiti in colonna. L'analisi avviene in GC/MS in modalità SIM (*Selected Ion Monitoring*) acquisendo uno ione target e due ioni qualificatori per ogni analita.

La taratura è a sei livelli da 0.00005 a 0.002 µg/l per ogni analita. La taratura avviene analizzando aliquote da 100 ml di acqua purificata addizionate, come i campioni, di 10 ml di metanolo e degli standard interni, oltre che dell'aliquota di soluzione standard di analiti necessaria a realizzare la concentrazione desiderata.

2.1.8 *Determinazione strumentale*

La determinazione strumentale degli IPA negli estratti di acqua può essere condotta mediante GC/MS, GC/MS/MS o HPLC con rivelatore a fluorescenza. Per gli analiti con maggiori requisiti di sensibilità risulta difficile, e in alcuni casi impossibile, il completo raggiungimento della conformità impiegando tecniche che non siano la GC/MS/MS.

In particolare, la determinazione in HPLC del benzo [a] pirene, considerata l'impossibilità di aumentare significativamente il volume di iniezione senza pregiudicare la cromatografia, richiede l'impiego di un rivelatore particolarmente sensibile, se necessario accoppiato a una tecnica cromatografica liquida a prestazioni ultra elevate (UHPLC), per ottenere picchi più stretti e quindi con un rapporto segnale/rumore più elevato.

Non tutti i rivelatori a fluorescenza commercialmente disponibili consentono di raggiungere la sensibilità necessaria e dunque l'impiego della tecnica HPLC deve essere valutata anche in funzione delle capacità dello specifico strumento a disposizione del laboratorio.

La determinazione degli IPA mediante GC/MS, in particolare a singolo quadrupolo, che è il tipo di strumento più diffuso in campo ambientale, richiede l'adozione di diversi accorgimenti per cercare di incrementare il più possibile la sensibilità strumentale.

La modalità di acquisizione dati dovrebbe essere SIM a meno che, per lo strumento specifico, la modalità SIM/SCAN non comporti alcuna perdita di intensità nei segnali degli ioni di interesse.

È preferibile adottare una modalità di iniezione che consenta l'introduzione di volumi di campione sensibilmente maggiori di quelli tipici della modalità *splitless*. In considerazione della possibilità di un'iniezione in *solvent vent*, è preferibile non estremizzare la concentrazione dell'estratto a volumi finali inferiori a 1 ml, quanto piuttosto cercare di incrementare il fattore di concentrazione, introducendo volumi maggiori di campione estratto nel gascromatografo.

I parametri operativi dell'iniezione in modalità *solvent vent*, a maggior ragione nel caso di un gruppo di analiti di diversa volatilità come gli IPA, devono essere accuratamente messi a punto al fine di evitare la perdita di quelli più volatili, l'irregolare trasferimento di quelli più pesanti e, in generale, la non riproducibilità dell'iniezione. Le impostazioni dell'elettromoltiplicatore del rivelatore devono essere tali da incrementare il più possibile la risposta per gli analiti più critici.

È probabile che, per quanto si adottino tutti gli accorgimenti possibili, ci siano analiti per cui la sensibilità, specialmente in matrice e considerando i recuperi analitici, non raggiunga la piena conformità alla prescrizione normativa.

La tecnica GC/MS/MS risulta generalmente adeguata alla determinazione anche degli IPA più impegnativi in virtù del miglior rapporto segnale/rumore. Essa appare l'unica tecnica che può essere indicata per l'esecuzione del monitoraggio degli IPA nelle acque marine ai sensi del D.lgs. 172/2015 senza dover aggiungere ulteriori requisiti e condizioni.

In GC/MS devono essere monitorati almeno due ioni per ogni analita (due transizioni in GC/MS/MS). I tempi di acquisizione (*dwell time*) degli ioni (o transizioni) devono essere stabiliti in modo tale che ogni picco sia disegnato da non meno di 7 punti. Per compensare la scarsa intensità di alcuni ioni di conferma, può essere utile incrementare il *dwell time* nella misura in cui ciò non pregiudichi la frequenza di campionamento complessiva.

È consigliabile, nei limiti del raggiungimento della risoluzione cromatografica necessaria, impiegare un programma di riscaldamento del forno relativamente rapido in quanto gli analiti che eluiscono per ultimi tendono a avere una forma scodata che non favorisce la sensibilità analitica.

Di seguito, si riportano alcuni esempi di condizioni operative strumentali, relative alle tre tecniche sopra richiamate, impiegabili per la determinazione di IPA in acque di mare.

Iniezione in GC di grandi volumi (LVI) in modalità solvent vent

Numerosi parametri devono essere ottimizzati affinché l'iniezione LVI risulti efficace e riproducibile. La temperatura iniziale dell'iniettore, oltre a essere inferiore a quella di evaporazione del solvente, deve essere la più bassa possibile (eventualmente impiegando anche un fluido criogenico come la CO₂ liquida) per

minimizzare la perdita dei composti più volatili, in particolare il naftalene, nella fase di eliminazione del solvente.

La temperatura del forno deve essere minore, o al limite uguale, a quella dell'iniettore per poter raggiungere l'equilibrio termico dopo ogni corsa cromatografica (a meno che non si usi un criogenico per sottoraffreddare l'iniettore).

In assenza di criogenico la temperatura del forno deve essere impostata poco al di sopra della massima temperatura ambiente che può essere in ogni caso mantenuta dal sistema di climatizzazione del laboratorio e la temperatura dell'iniettore deve essere impostata poco al di sopra di quella del forno.

Il solvente di iniezione deve avere una volatilità tale da costituire un compromesso tra l'esigenza di non inficiare la correttezza del volume finale determinato per l'estratto e l'esigenza di eliminare il solvente nell'iniettore senza perdere gli analiti più volatili.

La velocità di iniezione della siringa non deve essere troppo elevata per non creare un accumulo di liquido nella parte inferiore del liner (diminuendo così l'efficienza e la riproducibilità dell'evaporazione del solvente), né troppo bassa da far sì che la superficie di evaporazione e adsorbimento degli analiti sia costituita dall'ago della siringa piuttosto che dalla superficie del liner.

L'eventuale tempo di attesa fra un'iniezione e la successiva (nel caso, comune, di iniezioni multiple per raggiungere il volume desiderato) dipende dalla velocità di evaporazione del solvente nelle condizioni selezionate e deve essere sufficiente a garantire la completa eliminazione dell'aliquota di solvente precedente.

Per l'iniezione LVI sono da evitare i liner a pareti dritte mentre sono preferibili quelli con profilo interno a elica, inoltre sono più appropriati i liner di diametro interno ridotto (circa 1 mm) rispetto a quelli per l'iniezione *splitless*. Questi accorgimenti permettono sia di avere quella minore inerzia termica necessaria al rapidissimo riscaldamento, sia di ottenere una maggiore velocità di flusso del gas di trasporto in modo da trasferire gli analiti in colonna rapidamente e efficacemente, limitando i percorsi diffusivi e richiedendo temperature meno elevate.

La pressione e il flusso di eliminazione del solvente (*vent pressure* e *vent flow*) devono essere scelti in modo da reprimere l'evaporazione degli analiti volatili, ma allo stesso tempo favorire l'espulsione del solvente.

Il tempo di eliminazione del solvente (*vent time*) deve essere sufficiente per eliminare tutto il solvente, ma non troppo lungo per evitare la perdita degli analiti volatili.

La temperatura di desorbimento degli analiti deve essere sufficientemente elevata da consentire il completo desorbimento dei composti meno volatili; la fase di desorbimento (con il forno ancora alla temperatura iniziale) deve essere protratta per un tempo sufficiente a consentire il passaggio completo della totalità degli analiti in testa alla colonna; la temperatura di desorbimento degli analiti non deve essere più elevata del necessario per non introdurre in colonna anche materiale altobollente eventualmente presente negli estratti dei campioni; il flusso in colonna può essere aumentato nella fase di desorbimento termico allo scopo di accelerare il trasferimento.

In caso di presenza, negli estratti dei campioni, di quantità elevate di composti altobollenti l'iniezione LVI può comportare una minore stabilità a lungo termine del sistema GC/MS rispetto a un iniettore *splitless*.

Un accorgimento che può aiutare a mantenere la stabilità nel tempo del sistema analitico è, se disponibile per lo strumento in uso, l'impiego di una fase finale di corsa in controflusso della colonna a alta temperatura sia del forno sia dell'iniettore (quest'ultima possibilmente più alta di quella durante la fase di desorbimento termico degli analiti).

Esempio di parametri di acquisizione SIM in GC/MS (EN 16691:2015)

In Tabella 4 si riportano esempi di ioni di quantificazione e di conferma per gli IPA e i rispettivi standard interni nel caso di determinazione in GC/MS in modalità SIM.

Tabella 4. Ioni di quantificazione e di conferma degli IPA. I numeri in parentesi indicano intensità relative dello ione qualificatore rispetto a quello principale; i numeri in corsivo indicano che spesso lo ione in questione non è presente.

Sostanza	Ione diagnostico		
	1 m/z	2 m/z	3 m/z
Antracene	178 (100)	176 (18)	76 (3)
Antracene-d10	188 (100)	184 (14)	
Benzo [a] pirene	252 (100)	250 (24)	113 (11)
Benzo [a] pirene-d12	264 (100)	260 (20)	
Benzo [b] fluorantene	252 (100)	250 (20)	126 (5)
Benzo [b] fluorantene-d12	264 (100)	260 (23)	
Benzo [k] fluorantene	252 (100)	250 (22)	126 (5)
Benzo [k] fluorantene-d12	264 (100)	260 (19)	
Benzo [g,h,i] perilene	276 (100)	274 (22)	<i>138 (12)</i>
Benzo [g,h,i] perilene-d12	288 (100)	284 (19)	
Fluorantene	202 (100)	200 (20)	100 (3)
Fluorantene-d10	212 (100)	208 (17)	
Indeno [1,2,3-cd] pirene	276 (100)	274 (22)	<i>138 (12)</i>
Indeno [1,2,3-cd] pirene-d12	288 (100)	284 (19)	

Esempio di parametri di acquisizione MRM in GC/MS/MS

In Tabella 5 e Tabella 6 si riportano esempi di transizioni di quantificazione e, quando disponibili, di conferma per gli analiti e i rispettivi standard interni, nel caso di determinazione in GC/MS/MS in modalità MRM.

Tabella 5. Transizioni MRM per gli analiti.

Sostanza	Ione padre	Ione figlio	Tensione cella coll. (V)
Antracene	178	176.0	34
Benzo [a] pirene	252	250	42
	252	248	40
Benzo [b+j] fluorantene	252	250	42
	252	248	40
Benzo [g,h,i] perilene	276	274	42
Benzo [k] fluorantene	252	250	42
	252	248	40
Fluorantene	202	201	30
	202	200	50
Indeno [1,2,3-cd] pirene	276	274	38
Naftalene	128	127	20
	128	102	22

Tabella 6. *Transizioni MRM per gli standard interni.*

Sostanza	Ione padre	Ione figlio	Tensione cella coll. (V)
Antracene D10	188	160	34
Benzo [a] pirene D12	264	260	42
Dibenzo [a,h] antracene D14	292	288	40
Fluorantene D10	212	210	30
Naftalene-d8	136	108	25

Esempio di parametri di acquisizione HPLC-FLD (ARPAL)

Vengono di seguito riportate, a titolo di esempio, le condizioni operative per la determinazione strumentale in HPLC/FLD. Tali condizioni operative consentono la determinazione anche di altri IPA oltre a quelli richiesti dalla normativa nelle acque. L'analisi viene condotta in HPLC (Waters 600 con Fluorimetro 2475 e PDA 2998). La colonna è una Waters PAH 250 x 4.6 mm, 5 μ m, il gradiente utilizzato è il seguente:

- t = 0 min: 40% acqua, 60% acetonitrile;
- t = 12 min: 100% acetonitrile;
- t = 23 min: 100% acetonitrile;
- t = 28 min: 40% acqua, 60% acetonitrile.

L'analisi vera e propria si svolge in 25 minuti, tempo sufficiente per la completa risoluzione dei 16 IPA presi in considerazione. L'eluizione del campione viene monitorata a 254 nm con il rivelatore PDA (a serie di diodi), mentre il detector a fluorescenza è programmato per variare le lunghezze d'onda di eccitazione e emissione in funzione del tempo di eluizione dei diversi IPA (Tabella 7).

Tabella 7. *Lunghezze d'onda di eccitazione e emissione degli IPA.*

Sostanza	Tempi di ritenzione (min)	λ_{ex} di eccitazione (nm)	λ_{em} di emissione (nm)
Antracene	10.3	250	406
Benzo [a] antracene	14.8	265	380
Crisene	15.6		
Acenaftene	7.8		
Fluorene	8.2	280	330
Naftalene	5.8		
Fenantrene	9.1	246	370
Fluorantene	11.2	280	450
Pirene	12.0	270	390
Benzo [e] pirene	17.1		
Benzo [b] fluorantene	17.5	290	430
Benzo [k] fluorantene	18.7		
Benzo [a] pirene	19.5		
Dibenzo [a,h] antracene	21.2	290	410
Benzo [g,h,i] perilene	21.7		
Indeno [1,2,3-cd] pirene	23.0	300	500

La taratura ottenuta con il fluorimetro copre l'intervallo 0.05-100 ng/l, mentre la taratura con il rivelatore PDA copre l'intervallo 0.01-1 µg/l. Il LOQ viene identificato con il punto più basso della curva: 0.05 ng/l per il benzo [a] pirene e 0.1 ng/l per gli altri IPA.

2.1.9 Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

L'identificazione dell'analita avviene, in HPLC, in base all'individuazione del picco sullo specifico segnale di eccitazione/emissione, all'interno della finestra del tempo di ritenzione determinata dall'analisi di una soluzione standard; in GC/MS l'identificazione dell'analita avviene in base all'individuazione degli specifici ioni (o transizioni), nel caratteristico rapporto di intensità relative, all'interno della finestra del tempo di ritenzione determinata dall'analisi di una soluzione standard.

In HPLC la taratura avviene mediante standard esterno, mentre in GC/MS (e GC/MS/MS) la taratura viene eseguita mediante standard interni (selezionando il più simile all'analita tra quelli della miscela di standard interni impiegata).

In HPLC la regressione viene eseguita mettendo in relazione l'area del picco dell'analita rispetto alla sua concentrazione, la linearità della regressione è considerata accettabile se superiore a 0.99. In GC/MS la regressione viene eseguita mettendo in relazione il fattore di risposta (rapporto fra aree e concentrazioni) dell'analita rispetto al suo standard interno usando l'area dello ione (o della transizione) primario.

La taratura deve coprire l'intero intervallo di concentrazioni da determinare; qualora le concentrazioni misurate risultassero superiori al punto più alto della taratura è necessario procedere alla diluizione dell'estratto e alla nuova analisi. Il punto più basso della taratura invece dovrebbe per lo meno corrispondere, in base al fattore di arricchimento fra campione e estratto, al LOQ richiesto per l'analita.

La determinazione dei recuperi in HPLC viene fatta quantificando, mediante taratura con standard esterni, gli standard surrogati (IPA deutерati o IPA fluorurati) aggiunti al campione all'inizio del procedimento di estrazione.

La determinazione dei recuperi viene fatta, in GC/MS mediante quantificazione degli standard interni sulla base della concentrazione nota dello standard di siringa (standard interno di iniezione) aggiunto all'estratto alla fine del procedimento di estrazione e prima della determinazione strumentale.

I risultati, espressi in ng/l dovrebbero essere espressi con due cifre significative.

È responsabilità del laboratorio dimostrare inizialmente e verificare durante l'applicazione che la metodologia prescelta consenta di raggiungere le prestazioni analitiche prescritte riguardo al limite di quantificazione e all'incertezza. In particolare è responsabilità del laboratorio verificare che l'insieme delle procedure impiegate per l'estrazione del campione, la purificazione e la concentrazione dell'estratto, la determinazione strumentale sia in grado di identificare e quantificare in maniera affidabile e ripetibile gli analiti, in matrice, alle concentrazioni richieste dai limiti normativi. Nella verifica iniziale del metodo il laboratorio deve eseguire una valutazione sperimentale almeno dei recuperi e della precisione a concentrazioni diverse, in particolare a quelle corrispondenti al LOQ e allo SQA.

Nel corso delle analisi dei campioni ambientali il laboratorio deve impiegare strumenti di assicurazione della qualità del dato che comprendano, come minimo:

- l'esecuzione a ogni *batch* di estrazione di:
 - un bianco di procedimento
 - una prova di recupero (bianco fortificato)
 - repliche, se disponibili più aliquote di campione di acqua, in numero non inferiore a una per ogni dieci campioni
 - dell'uso, per tutti i campioni, di standard aggiunti in quantità nota (siano essi standard interni o surrogati) per la valutazione del recupero
- l'analisi, a ogni *batch* di determinazione strumentale (almeno all'inizio e alla fine, preferibilmente anche durante) di:
 - standard per la verifica della validità della taratura (sia a alte sia a basse concentrazioni)
 - bianchi strumentali.

Il laboratorio deve partecipare a esercizi di confronto interlaboratorio sulla matrice specifica per gli analiti di interesse.

Il laboratorio deve adottare criteri di accettabilità per parametri relativi al controllo di qualità, quali: recupero degli standard interni o surrogati nei campioni incogniti, recupero degli analiti nel campione fortificato, entità di concentrazioni accettabili nel bianco di procedimento e nei bianchi strumentali, entità dello scostamento fra le repliche, scostamento degli standard di verifica di validità della taratura dai valori nominali, rapporto di intensità tra ione primario e ione qualificatore, ecc.

Inizialmente i valori di accettabilità possono essere stabiliti a priori (ad esempio, un intervallo 60-120% per i recuperi, un $\pm 20\%$ sulla concentrazione nominale degli standard, ecc.), mentre successivamente possono essere calcolati dall'analisi dei dati sul controllo qualità prodotti durante un significativo periodo di tempo.

In questo modo possono essere stabiliti criteri più realistici e specifici per il laboratorio; ad esempio, mediante la costruzione e l'aggiornamento di carte di controllo, strumenti in grado di evidenziare eventuali tendenze o deviazioni dal normale funzionamento del metodo.

2.2 Determinazione di IPA nei sedimenti marini

I valori di SQA per i sedimenti fissati dal D.lgs. 172/2015 permettono il raggiungimento dei LOQ impiegando procedure tradizionali di estrazione, purificazione e determinazione strumentale (Tabella 8). Ciononostante è necessario evidenziare che le condizioni operative della fase di determinazione strumentale devono essere specifiche per le concentrazioni peculiari della matrice sedimento e non devono essere impiegate condizioni operative predisposte per matrici, quali suoli o rifiuti, che solitamente presentano concentrazioni ben più elevate.

Tabella 8. SQA e LOQ richiesti per la determinazione degli IPA nei sedimenti marini.

IPA	SQA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ * ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Naftalene	35	10.5
Antracene	24	7.2
Fluorantene	110	33
Benzo [a] pirene	30	9
Benzo [b] fluorantene	40	12
Benzo [k] fluorantene	20	6
Benzo [g,h,i] perilene	55	16.5
Indeno [1,2,3-cd] pirene	70	21

* Limite di quantificazione ai sensi del D.lgs. 219/2010 (2009/90/CE e 2008/105/CE).

2.2.1 Ricognizione metodologie ufficiali esistenti

Esistono diverse norme tecniche internazionali che descrivono metodologie analitiche, in GC/MS e/o HPLC/FLD, e consentono di determinare gli IPA in matrici quali terreni e sedimenti fino a una concentrazione di 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tabella 9). Sebbene tale LOQ non sia pienamente conforme a quanto richiesto per la determinazione di alcuni IPA nei sedimenti, si ritiene che, con l'adozione di alcuni accorgimenti, le tecniche in questione siano in grado di raggiungere le prestazioni necessarie.

Tabella 9. Metodologie ufficiali nazionali e internazionali per la determinazione di IPA negli organismi marini.

Metodo	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Determinazione strumentale
ICRAM 2001, Metodologie analitiche di riferimento	1	HPLC/FLD
ISO 13877 : 1998	10	HPLC
ISO 18287 : 2006	10	(GC/MS)
ISO 13859 : 2014	10	(GC/MS o HPLC/FLD)

2.2.2 Ricognizione delle prestazioni delle metodiche impiegate dalle Agenzie

Sulla base dei dati raccolti dal Gruppo di Lavoro 4 del SNPA, come riportato nel volume “*Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine - Verifica delle metodologie ufficiali esistenti e la loro applicabilità alle matrici marine*”, è stato possibile avere un quadro completo delle metodologie impiegate dalle varie Agenzie e dei relativi limiti di quantificazione.

In base ai dati aggiornati a maggio 2016, le metodologie usate dalle Agenzie sono generalmente rispondenti ai requisiti di sensibilità per tutti i composti (97 conformità e 7 non conformità). Nove Agenzie utilizzano il metodo EPA 8270 (GC/MS), tre il metodo EPA 8310 (HPLC) e una ISO 13877 con determinazione strumentale tramite HPLC. Le poche non conformità si ritiene siano risolvibili in maniera relativamente agevole essendo le metodologie impiegate uguali a quelle adottate dalle altre Agenzie (EPA 8270 e HPLC).

Sulla base delle metodologie standardizzate esistenti e di quelle impiegate dalle Agenzie, si riportano nei paragrafi successivi i dettagli dei procedimenti analitici applicabili per la determinazione degli IPA nei sedimenti marini.

2.2.3 Principio del metodo

Il campione di sedimento viene sottoposto a setacciamento e viene analizzata solo la frazione passante il vaglio di 2 mm, successivamente macinata e omogeneizzata. Il campione, che può essere analizzato umido o liofilizzato, viene fortificato con standard interni (determinazione GC/MS o GC/MS/MS) o standard surrogati (determinazione in HPLC/FLD) e sottoposto a estrazione secondo diverse modalità: estrazione solido-liquido in *soxhlet*, a fluido pressurizzato, assistita dalle microonde o da ultrasuoni.

L'estratto viene concentrato e purificato per cromatografia di adsorbimento su gel di silice o per cromatografia di gel permeazione (GPC); viene portato al volume finale in un solvente idoneo all'iniezione strumentale, addizionato di standard di siringa o standard interno di iniezione (nel caso di determinazione GC/MS o GC/MS/MS) e quindi avviato all'analisi strumentale.

Per il solo naftalene, oltre all'analisi con il metodo per semivolatili summenzionato, è possibile applicare una tecnica di determinazione mediante SPME (*Solid Phase Micro Extraction*) su un'aliquota di sedimento umido.

2.2.4 Campionamento e conservazione del campione

Il campione di sedimento deve pervenire refrigerato o congelato in laboratorio e deve essere conservato a temperatura di -18°C. Il campione di sedimento può essere liofilizzato, a patto che si prendano precauzioni contro il reflusso dell'olio della pompa da vuoto nella camera di liofilizzazione.

La liofilizzazione stabilizza il campione consentendo una più agevole conservabilità e facilita le operazioni di setacciatura, di macinazione e di estrazione solido-liquido, ma al tempo stesso potrebbe parzialmente inficiare la determinazione dei componenti più volatili quali il naftalene.

L'essiccamento del campione di sedimento all'aria sotto cappa o in stufa, anche a bassa temperatura, aumenta il rischio di perdita dei composti volatili.

Il sedimento deve essere setacciato su maglie da 2 mm e analizzata solo la frazione passante. Il risultato analitico della determinazione degli IPA deve essere espresso rispetto al peso secco della frazione passante.

Il campione dopo setacciatura, umido o liofilizzato, deve essere adeguatamente omogeneizzato e preferibilmente macinato.

2.2.5 Interferenze e cause di errore

È necessario verificare che i reagenti, i consumabili, la vetreria, le apparecchiature e la strumentazione impiegati non apportino interferenze nella determinazione degli analiti. Tale verifica deve essere effettuata al primo impiego dei suddetti materiali e durante tutto il periodo del loro utilizzo, inserendo l'analisi di bianchi di procedimento a ogni sequenza di estrazione. È della massima importanza selezionare solventi di elevata purezza e verificare che non apportino, in particolare dopo la loro concentrazione, interferenze significative nella determinazione.

Il sodio solfato e la silice, se utilizzata, devono essere purificati in muffola a 600°C per una notte e quindi conservati in essiccatore prima del loro utilizzo.

È preferibile evitare l'uso di plastiche al di fuori del PTFE, come anche impiegare filtri in fibra di vetro o di acciaio piuttosto che di cellulosa.

È necessario assicurare che il campione e in particolare l'estratto in solvente organico siano mantenuti al riparo dalla luce solare diretta allo scopo di evitare la fotodegradazione di alcuni analiti sensibili. In tal senso può essere utile l'impiego di vetreria ambrata e di fogli di alluminio.

Le interferenze cromatografiche devono essere attentamente valutate e le condizioni operative del rivelatore scelte in modo da massimizzare la selettività per l'analita ricercato (selezione ottimale delle lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione nel caso di determinazione in HPLC/FLD, selezione ottimale di ioni o transizioni, di energie di collisione e di *dwell time* nel caso di determinazione in GC/MS o GC/MS/MS).

Nel caso vengano determinati altri IPA, oltre a quelli richiesti dal D.lgs. 172/2015, bisogna verificare che la risoluzione cromatografica di alcuni analiti, con tempi di ritenzione vicini, sia sufficiente per poter fornire un risultato come singolo analita ($R > 0.8$) o se non sia invece tale da dover riportare il risultato come somma di più analiti (ad esempio, in GC, la coppia fenantrene-antracene o il trio benzo [b]- benzo [j]- benzo [k]- fluorantene o l'interferenza sull'indeno [1,2,3-cd] pirene da parte del dibenzo [a,h] antracene o di altri composti).

2.2.6 Estrazione e purificazione

Ai fini di facilitare l'estrazione il campione umido viene solitamente mischiato con sodio solfato anidro, terra di diatomee o altro materiale inerte che assorba l'acqua fino a ottenere una polvere priva di grumi. Il campione liofilizzato può essere estratto tal quale e generalmente non richiede la successiva disidratazione dell'estratto organico. L'aliquota di campione sottoposto a estrazione deve essere tale da risultare sufficientemente rappresentativa, ma non deve essere eccessiva rispetto alla capacità di rimozione delle interferenze delle tecniche di purificazione impiegate. Generalmente un'aliquota di circa 5-8 g di sedimento secco soddisfa le esigenze analitiche.

L'estrazione può essere eseguita mediante tecniche solido-liquido come estrazione soxhlet, a fluido pressurizzato, estrazione assistita dalle microonde o da ultrasuoni, impiegando preferibilmente una miscela di solventi apolare e polare.

La tipologia e l'entità della purificazione dell'estratto da eseguire dipendono dal tipo di tecnica di determinazione strumentale impiegata oltre che dal carico e dalla natura di sostanze interferenti coestratte insieme agli IPA. Nel caso di determinazione gascromatografica è necessario eseguire una purificazione dallo zolfo (mediante reazione con rame metallico, o tetrabuttilammonio solfito o mercurio metallico, o attraverso una cromatografia di gel permeazione, ecc.) e una riduzione del carico di sostanze altobollenti che si depositerebbero nel liner dell'iniettore.

La rimozione di interferenti polari può essere eseguita mediante cromatografia di adsorbimento su silice. La rimozione di interferenti di grande dimensione molecolare, polari o meno, può essere eseguita mediante GPC. Nel caso di determinazione in HPLC/FLD, per estratti non eccessivamente carichi di interferenti, potrebbe non essere necessario alcun *clean up* oltre la filtrazione.

Allo scopo di minimizzare la perdita o la degradazione degli analiti gli step di concentrazione dell'estratto devono essere eseguiti in condizioni blande (di temperatura e pressione o di flusso di azoto) evitando di portare il volume sotto a 1 ml.

Nel caso del *clean up* su colonna di silice questa deve essere accuratamente purificata prima dell'uso. Nel caso si impieghi un procedimento di purificazione della silice per estrazione con solventi deve essere attentamente verificata l'assenza di residui di contaminazione. In caso tale purificazione non sia sufficiente per eliminare apporti di contaminazione si consiglia di tenere la silice (secca) per una notte in muffola a 600°C.

La colonna di purificazione di silice deve essere sormontata da uno strato di sodio solfato anidro, anch'esso purificato in muffola; lo strato di adsorbente deve essere ben condizionato in solvente realizzando un impaccamento omogeneo, privo di bolle d'aria e cammini preferenziali, che non deve mai essere lasciato andare a secco. Il campione viene caricato in estratto apolare e gli IPA vengono eluiti con una miscela circa 1:1 di esano e diclorometano.

Nel caso si effettui l'eluizione di una prima frazione di scarto con solvente apolare è necessario monitorare costantemente l'effettivo frazionamento degli IPA per non rischiare di scartare analiti che dovessero eventualmente eluire nella prima frazione.

La purificazione mediante GPC è adatta all'analisi di sedimenti in quanto consente di scartare la frazione finale contenente zolfo e quella iniziale contenente eventuali composti altobollenti, che possono creare problemi di accumulo nei liner degli iniettori dei gascromatografi. La GPC si presta inoltre molto bene a essere utilizzata come tecnica primaria di *clean up* nel caso di metodi analitici multicomponente in quanto, non basandosi su reazioni chimiche, non comporta rischi di perdita di analiti degradabili ed è possibile applicarla a un'amplessima varietà di analiti. La tecnica si basa sulla discriminazione dimensionale delle molecole per mezzo di un gel idrofobico poroso (Stirene-Divinilbenzene).

Le colonne impiegate possono essere sia in vetro da impaccare a mano (operazione da svolgere con molta cura), sia in acciaio già impaccate di fabbrica in uno specifico solvente. È molto importante assicurarsi che la fase stazionaria sia ben condizionata nello specifico solvente scelto e che lo rimanga costantemente. I solventi impiegabili sono di diversa tipologia ma generalmente, dati i volumi di campione da iniettare e i flussi di lavoro dell'ordine dei 5 ml/min, le quantità di solvente consumate sono significative.

È consigliabile impiegare strumentazione specificamente dedicata alla GPC che per tipologia di solventi, per flussi, per volumi di iniezione e di frazioni raccolte sono alquanto diversi rispetto a un HPLC analitico. Per poter eseguire in maniera automatizzata la purificazione di una serie di campioni è necessario dotarsi di autocampionatore adatto alla GPC e di un raccoglitore di frazioni.

È necessario individuare accuratamente la frazione (i tempi di raccolta dell'eluato) in cui vengono eluiti gli analiti sia impiegando miscele standard specifiche per GPC (disciolte nello stesso solvente o miscela di solventi in cui viene eseguita la tecnica), sia eseguendo prove di recupero relative alla sola fase di purificazione per GPC. È necessario verificare costantemente la stabilità dei tempi di eluizione (possibilmente termostatando la colonna) ed è consigliabile lasciare un margine di sicurezza anche a scapito di una purificazione leggermente inferiore.

Il campione deve essere disciolto nel solvente usato per la GPC, deve essere filtrato a 5 µm e non deve essere eccessivamente viscoso. Una prima frazione viene scartata e contiene i composti coestratti di maggiori dimensioni molecolari rispetto agli analiti, mentre una seconda frazione, contenente i composti di interesse, viene raccolta e concentrata.

Nel caso dei sedimenti marini è essenziale scartare la terza frazione che può contenere quantità di zolfo anche notevoli. Per rimuovere le interferenze residue ancora presenti nella frazione concentrata può essere applicata una tecnica di purificazione che si basa su un diverso principio, come l'adsorbimento su gel di silice, utile per rimuovere sostanze polari.

Il naftalene è l'analita più volatile del gruppo di IPA previsti dalla normativa e può essere determinato come semivolatile insieme agli altri IPA o come volatile mediante SPME. Nel primo caso si devono adottare accortezze per minimizzare le perdite per evaporazione, nel secondo caso si deve verificare che le condizioni operative consentano effettivamente di raggiungere il LOQ richiesto dal valore di SQA.

Esempio di estrazione SPME (ARPA FVG)

Vengono di seguito riportate, a titolo di esempio, le condizioni operative impiegate da ARPA FVG per la determinazione del solo naftalene mediante estrazione in fase solida su microfibra (SPME).

Un'aliquota di circa 1g di sedimento umido viene pesata accuratamente in un *vial* da 20 ml specifico per SPME e contenente 2 g di NaCl. Vengono aggiunti standard interno (naftalene-d8) e 7 ml di acqua purificata. Il *vial* viene tappato e sottoposto a estrazione. Il campione viene incubato a 40°C per 15' e estratto per 25' impiegando una fibra 85 µm Carboxen/PDMS stableflex (*light blue*). La fibra viene desorbita nell'iniettore (260°C) per 5'.

La strumentazione impiegata è un GC/MS a singolo quadrupolo con autocampionatore CTC Gerstel MPS2 che permette di utilizzare fibre SPME. La modalità di acquisizione è in SIM, monitorando lo ione di massa 128 per il naftalene e 136 per lo standard interno.

La retta di taratura viene costruita analizzando un sedimento esente da naftalene fortificato con quantità crescenti di naftalene (da 1 µg/kg a 200 µg/kg). Il LOQ corrisponde al primo punto della curva (1 µg/kg).

2.2.7 Determinazione strumentale

La determinazione strumentale può essere condotta mediante GC/MS (o GC/MS/MS) o HPLC/FLD e, impiegando metodologie tradizionali che prevedano estrazione e concentrazione dell'estratto, possono essere raggiunti limiti di quantificazione dell'ordine di 1 µg/kg sul peso secco. Tali prestazioni sono ampiamente conformi ai requisiti determinati dai valori di SQA stabiliti dal D.lgs. 172/2015.

In generale le metodiche di determinazione strumentale che impiegano la spettrometria di massa consentono l'uso di standard interni marcati isotopicamente in ragione di un composto marcato per ognuno degli analiti ricercati. Si raccomanda, quindi, questa pratica senza tuttavia prescindere dal raggiungimento di un adeguato recupero analitico.

Nel caso di determinazione strumentale effettuata mediante HPLC con rivelatore a fluorescenza, l'uso di standard interni marcati isotopicamente per ogni analita può essere possibile in base all'effettiva capacità di risolvere cromatograficamente, nel tracciato della relativa lunghezza d'onda di emissione, lo standard marcato dall'analita nativo o da altri picchi presenti nel cromatogramma.

In questo caso si raccomanda di impiegare tutti gli standard interni che sia possibile quantificare con affidabilità e si segnala la possibilità di utilizzare, oltre che composti marcati col deuterio, anche IPA monofluorurati.

La tecnica GC/MS/MS è sicuramente adeguata alla determinazione degli IPA negli estratti di sedimento, ma anche la meno costosa. GC/MS, in particolare a singolo quadrupolo, è lo strumento più diffuso in ambito ambientale, ed è generalmente in grado di soddisfare i requisiti, specialmente se vengono adottati accorgimenti per incrementare la sensibilità strumentale.

La modalità di acquisizione dati dovrebbe essere SIM a meno che, per lo strumento specifico, la modalità SIM/SCAN non comporti alcuna perdita di intensità nei segnali degli ioni di interesse.

È possibile adottare una modalità di iniezione in *solvent vent* che consenta l'introduzione di volumi di campione maggiori di quelli tipici della modalità *splitless*. In questo caso, i parametri operativi, a maggior ragione nel caso di un gruppo di analiti di volatilità eterogenea come gli IPA, devono essere accuratamente messi a punto al fine di evitare perdita degli analiti più volatili, irregolare trasferimento di quelli più pesanti e generale irriproducibilità dell'iniezione.

Le impostazioni dell'elettromoltiplicatore del rivelatore devono essere tali da garantire una risposta sufficiente per gli analiti più impegnativi.

In GC/MS devono essere monitorati almeno due ioni per ogni analita (due transizioni in GC/MS/MS) e i tempi di acquisizione (*dwell time*) degli ioni (o transizioni) devono essere stabiliti in modo tale che ogni picco sia disegnato da non meno di 7 punti.

Per compensare la scarsa intensità di alcuni ioni di conferma può essere utile incrementare, per questi, il *dwell time* nella misura in cui ciò non pregiudichi la frequenza di campionamento complessiva.

È consigliabile, nei limiti del raggiungimento della risoluzione cromatografica necessaria, impiegare un programma di riscaldamento del forno relativamente rapido in quanto gli analiti che eluiscono per ultimi tendono ad avere una forma scodata che non favorisce la sensibilità analitica.

Si riportano di seguito alcuni esempi di condizioni operative strumentali, relative alle tre tecniche sopra richiamate, impiegabili per la determinazione di IPA.

Esempio di parametri di acquisizione SIM in GC/MS

In Tabella 10 si riportano esempi di ioni di quantificazione e conferma per gli analiti e i rispettivi standard interni nel caso di determinazione in GC/MS in modalità SIM.

Tabella 10. Ioni di quantificazione e di conferma degli IPA.

Sostanza	Ione diagnostico		
	1 m/z	2 m/z	3 m/z
Naftalene	128 (100)	127	129
Naftalene-d8	136 (100)	134 (11)	137 (11)
Antracene	178 (100)	176 (18)	76 (3)
Antracene-d10	188 (100)	184 (14)	
Fluorantene	202 (100)	200 (20)	100 (3)
Fluorantene-d10	212 (100)	208 (17)	
Benzo [a] pirene	252 (100)	250 (24)	113 (11)
Benzo [a] pirene-d12	264 (100)	260 (20)	
Benzo [k] fluorantene	252 (100)	250 (22)	126 (5)
Benzo [k] fluorantene-d12	264 (100)	260 (19)	
Benzo [b] fluorantene	252 (100)	250 (20)	126 (5)
Benzo [b] fluorantene-d12	264 (100)	260 (23)	
Indeno [1,2,3-cd] pirene	276 (100)	274 (22)	138 (12)
Indeno [1,2,3-cd] pirene-d12	288 (100)	284 (19)	
Benzo [g,h,i] perilene	276 (100)	274 (22)	138 (12)
Benzo [g,h,i] perilene-d12	288 (100)	284 (19)	

I numeri in parentesi indicano le intensità relative dello ione qualificatore rispetto allo ione principale, i numeri in corsivo indicano che spesso lo ione in questione non è presente.

Esempio di parametri di acquisizione MRM in GC/MS/MS

Le Tabella 11 e la Tabella 12 riportano esempi di transizioni di quantificazione e, quando disponibili, di conferma per gli analiti e i rispettivi standard interni, nel caso di determinazione in GC/MS/MS in modalità MRM.

Tabella 11. Transizioni MRM per gli analiti.

Sostanza	Ione padre	Ione figlio	Tensione cella coll. (V)
Antracene	178	176	34
Benzo [b+j] fluorantene	252	250	42
	252	248	40
Benzo [k] fluorantene	252	250	42
	252	248	40
Benzo [a]pirene	252	250	42
	252	248	40
Benzo [g,h,i] perilene	276	274	42
	202	201	30
Fluorantene	202	200	50
	276	274	38
Indeno [1,2,3-cd] pirene	276	274	38
Naftalene	128	127	20
	128	102	22

Tabella 12. *Transizioni MRM per gli standard interni.*

Sostanza	Ione padre	Ione figlio	Tensione cella coll. (V)
Antracene D10	188	160	34
Benzo[a]pirene D12	264	260	42
Dibenzo[a,h]antracene D14	292	288	40
Fluorantene D10	212	210	30
Naftalene-d8	136	108	25

Esempio di parametri di acquisizione HPLC-FLD

Le condizioni operative illustrate consentono la determinazione anche di altri IPA oltre a quelli richiesti dalla normativa nel sedimento. L'analisi viene condotta in HPLC (Waters 600 con Fluorimetro 2475 e PDA 2998). Il campione deve essere filtrato su membrane di porosità di 0.45µm o 0.20µm in PTFE o altro materiale inerte e non contaminante.

La colonna è la Waters PAH 250 x 4.6 mm, 5 µm, il gradiente utilizzato è il seguente:

- t = 0 min: 40% acqua, 60% acetonitrile;
- t = 12 min: 100% acetonitrile;
- t = 23 min: 100% acetonitrile;
- t = 28 min: 40% acqua, 60% acetonitrile.

L'analisi vera e propria si svolge in 25 minuti, tempo sufficiente per la completa risoluzione dei 16 IPA presi in considerazione. L'eluizione del campione viene monitorata a 254 nm con il rivelatore PDA (a serie di diodi), mentre il detector a fluorescenza è programmato per variare le lunghezze d'onda di eccitazione e emissione in funzione del tempo di eluizione dei diversi IPA (Tabella 7).

Le concentrazioni delle soluzioni di taratura coprono l'intervallo 0.05-100 ng/ml nel caso del fluorimetro e 0.01-1 µg/ml nel caso del rivelatore PDA.

2.2.8 Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

L'identificazione dell'analita avviene, in HPLC, in base all'individuazione del picco sullo specifico segnale di eccitazione/emissione, all'interno della finestra del tempo di ritenzione determinata dall'analisi di una soluzione standard, in GC/MS l'identificazione dell'analita avviene in base all'individuazione degli specifici ioni (o transizioni), nel caratteristico rapporto di intensità relative, all'interno della finestra del tempo di ritenzione determinata dall'analisi di una soluzione standard.

In GC/MS (e GC/MS/MS) la taratura viene effettuata mediante standard interni (selezionando il più simile all'analita tra quelli della miscela di standard interni impiegata), mentre in HPLC la taratura avviene mediante standard esterno. In GC/MS la regressione viene eseguita mettendo in relazione il fattore di risposta (rapporto fra aree e concentrazioni) dell'analita rispetto al suo standard interno usando l'area dello ione (o della transizione) primario. In HPLC la regressione viene eseguita mettendo in relazione l'area del picco dell'analita rispetto alla sua concentrazione. La linearità della regressione è considerata accettabile se superiore a 0.99. La taratura deve coprire l'intero intervallo di concentrazioni da determinare. Concentrazioni sull'estratto del campione che risultassero superiori al punto più alto della taratura richiedono la diluizione dell'estratto e la rianalisi. Il punto più basso della taratura dovrebbe per lo meno corrispondere, in base al fattore di arricchimento fra campione e estratto, al LOQ richiesto per l'analita.

La determinazione dei recuperi viene fatta, in GC/MS dalla quantificazione degli standard interni sulla base della concentrazione nota dello standard di siringa (standard interno di iniezione) aggiunto all'estratto alla fine del procedimento di estrazione e prima della determinazione strumentale.

La determinazione dei recuperi in HPLC viene fatta quantificando, mediante taratura con standard esterni, gli standard surrogati (IPA deuterati o IPA fluorurati) aggiunti al campione all'inizio del procedimento di estrazione.

I risultati, espressi in $\mu\text{g}/\text{kg}$ sul peso secco del campione dovrebbero essere espressi con due cifre significative.

È responsabilità del laboratorio dimostrare inizialmente e verificare durante l'applicazione che la metodologia prescelta consenta di raggiungere le prestazioni analitiche prescritte riguardo al limite di quantificazione e all'incertezza. In particolare è responsabilità del laboratorio verificare che l'insieme delle procedure di pretrattamento del campione, di estrazione, di purificazione, di concentrazione dell'estratto e di determinazione strumentale impiegate sia in grado di identificare e quantificare in maniera affidabile e ripetibile gli analiti, in matrice, alle concentrazioni richieste dai limiti normativi. Nella verifica iniziale del metodo il laboratorio deve effettuare una valutazione sperimentale almeno dei recuperi e della precisione a concentrazioni diverse, in particolare a quelle corrispondenti al LOQ e allo SQA.

Nel corso delle analisi dei campioni ambientali il laboratorio deve impiegare strumenti di assicurazione della qualità del dato che comprendano, come minimo:

- l'esecuzione a ogni *batch* di estrazione di:
 - bianco di procedimento,
 - bianco fortificato o campione fortificato,
 - repliche in numero non inferiore a una per ogni 10 campioni e
 - l'uso, per tutti i campioni, di standard aggiunti in quantità nota per la valutazione del recupero;
- l'analisi, a ogni *batch* di determinazione strumentale (almeno all'inizio e alla fine, preferibilmente anche durante) di:
 - standard per la verifica della validità della taratura (sia a alte sia a basse concentrazioni)
 - bianchi strumentali.

Il laboratorio deve partecipare a esercizi di confronto interlaboratorio sulla matrice specifica per gli analiti specifici. È particolarmente raccomandata anche l'analisi, ogni volta che sia possibile, di campioni di riferimento del laboratorio cioè di matrici reali con concentrazioni note degli analiti. Tali campioni di riferimento possono essere materiali di riferimento certificati, o residui di campioni oggetto di esercizi di *proficiency testing* per i quali sono disponibili valori assegnati per i misurandi o campioni reali sufficientemente omogenei e stabili, che il laboratorio ha ben caratterizzato per averli ripetutamente analizzati nel tempo.

Il laboratorio deve adottare dei criteri di accettabilità per parametri relativi al controllo di qualità quali il recupero degli standard interni o surrogati nei campioni incogniti, il recupero degli analiti nel campione fortificato, l'entità di concentrazioni accettabili nel bianco di procedimento e nei bianchi strumentali, l'entità dello scostamento fra le repliche, lo scostamento degli standard di verifica di validità della taratura dai valori nominali, il rapporto di intensità tra ione primario e ione qualificatore, ecc.

Inizialmente i valori dei criteri di accettabilità possono essere stabiliti a priori (ad esempio, intervallo 60-120% per i recuperi, un $\pm 20\%$ sulla concentrazione nominale degli standard, ecc.), mentre successivamente essi possono essere calcolati dall'analisi dei dati sul controllo qualità prodotti durante un significativo periodo di tempo.

In questo modo possono essere stabiliti criteri più realistici e specifici per il laboratorio ad esempio mediante la costruzione e l'aggiornamento di carte di controllo, strumenti in grado di evidenziare eventuali tendenze o deviazioni dal normale funzionamento del metodo.

2.3 Determinazione di IPA in organismi marini

Il D.lgs. 172/2015 (2013/39/EU) prevede che, ai fini del confronto con lo SQA, nel biota (crostacei e molluschi, non pesci) siano ricercati il benzo [a] pirene in quanto marcatore degli altri IPA e il fluorantene. I valori di SQA sono espressi come peso umido (Tabella 13) e non pongono particolari problemi per il raggiungimento dei LOQ nel caso in cui s'impieghino tecniche di estrazione e purificazione tradizionali. Nel caso, invece, di utilizzo di tecniche più sbrigative, come i metodi QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*), la sensibilità richiesta è prossima al limite di quantificazione della metodica.

All'art. 1 comma 8 del D.lgs. 172/2015 si richiede inoltre che, ai fini dell'analisi della tendenza a lungo termine delle concentrazioni in sedimenti e biota, venga determinato anche l'antracene in quanto sostanza prioritaria che tende a accumularsi in tali matrici, anche se nello stesso decreto si riporta lo SQA solo per la matrice sedimento.

Tabella 13. SQA e LOQ richiesti per la determinazione degli IPA richiesti per il biota.

Sostanza	SQA µg/kg p.u.	LOQ* µg/kg p.u.
Fluorantene	30	9
Benzo [a] pirene	5	1.5

* Limite di quantificazione ai sensi del D.lgs. 219/2010 (2009/90/CE e 2008/105/CE).

2.3.1 Ricognizione metodologie ufficiali esistenti

Esistono diverse metodiche ufficiali per la determinazione di IPA in alimenti, grassi e oli vegetali o specificamente biota che consentono di raggiungere limiti di quantificazione adeguati (Tabella 14). Esse impiegano procedure convenzionali di estrazione, purificazione, concentrazione e determinazione strumentale in GC/MS o HPLC/FLD.

Tabella 14. Metodologie ufficiali nazionali e internazionali per la determinazione di IPA negli organismi marini.

Metodo	LOQ (µg/l)		Determinazione strumentale
BS EN 16619:2015	B [a] P = 0.5 µg/kg nei molluschi disidratati	Alimenti generici	Estrazione e clean up: combinazione di PLE, GPC, SPE. Determinazione strumentale: GC/MS; metodo non validato per Flt e Ant
ICRAM 2001, Metodologie analitiche di riferimento	Ant = 1 µg/kg p.s. B [a] P = 1 µg/kg p.s. Flt = 1 µg/kg p.s.	biota	Estrazione e clean up: saponificazione, purificazione su gel di silice; Determinazione strumentale: HPLC/FLD
ISO 22959:2009	Ant = 0.5 µg/kg B [a] P = 0.5 µg/kg Flt = 0.5 µg/kg	Grassi e oli animali e vegetali	Estrazione e clean up: DACC (<i>on-line donor-acceptor complex chromatography</i>); Determinazione strumentale: HPLC/FLD
ISO 15753:2016	Ant = 0.2 µg/kg B [a] P = 0.2 µg/kg Flt = 0.3µg/kg	Grassi e oli animali e vegetali	Estrazione con solventi, <i>clean up</i> per SPE (C18 e Florisil) Determinazione strumentale: HPLC/FLD

B [a] P = benzo [a] pirene; Flt = fluorantene; Ant = antracene.

2.3.2 Ricognizione delle prestazioni delle metodiche impiegate dalle Agenzie

Sulla base dei dati raccolti dal Gruppo di Lavoro 4 del SNPA, come riportato nel volume “*Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine - Verifica delle metodologie ufficiali esistenti e la loro applicabilità alle matrici marine*”, è stato possibile avere un quadro completo delle metodologie impiegate dalle varie Agenzie e dei relativi limiti di quantificazione.

In base ai dati aggiornati a maggio 2016, vi sono n. 7 Agenzie che eseguono la determinazione dei due analiti per i quali è previsto lo SQA. Quasi tutte le Agenzie che determinano il fluorantene risultano conformi al LOQ richiesto, mentre solo la metà di esse esegue con sensibilità sufficiente la determinazione del benzo [a] pirene, che presenta un valore di SQA inferiore rispetto al fluorantene.

Le tecniche impiegate dalle Agenzie per l'estrazione sono diverse: PFE (*Pressurized Fluid Extraction*), il metodo QuEChERS e bagno a ultrasuoni. Le tecniche di determinazione strumentale impiegate dalle Agenzie sono la GC/MS e l'HPLC.

Sulla base delle metodologie standardizzate esistenti e delle metodologie impiegate e fornite dalle Agenzie, si riportano nei paragrafi successivi i dettagli dei procedimenti analitici applicabili per la determinazione degli IPA nel biota.

2.3.3 Principio del metodo

Il campione viene ottenuto dalla dissezione dei tessuti degli organismi e può essere analizzato sia umido o liofilizzato, in questo caso va effettuata la determinazione del contenuto d'acqua.

Il campione viene fortificato con standard interni (determinazione GC/MS o GC/MS/MS) o con standard surrogati (determinazione in HPLC/FLD) e può essere sottoposto a estrazione secondo varie modalità: solido-liquido in soxhlet, a fluido pressurizzato, assistita dalle microonde o da ultrasuoni, mediante saponificazione e retroestrazione, metodo QuEChERS.

L'estratto proveniente da estrazioni solido-liquido viene concentrato e purificato per cromatografia di gel permeazione (GPC) o di adsorbimento su gel di silice, portato al volume finale in un solvente idoneo all'iniezione strumentale, addizionato di standard di siringa o standard interno di iniezione (nel caso di determinazione GC/MS o GC/MS/MS) e quindi avviato all'analisi strumentale.

2.3.4 Campionamento e conservazione del campione

I molluschi sono organismi sessili e sono molto meno capaci di metabolizzare gli IPA rispetto ai pesci teleostei. Gli organismi vivi devono essere trasportati in laboratorio a temperature comprese tra 5°C e 10°C in contenitori chiusi per evitare contaminazioni.

La dissezione deve essere eseguita mediante utensileria e contenitori decontaminati prelevando le parti molli di esemplari di taglia omogenea (70-90% della massima lunghezza della conchiglia) e conservandole in congelatore, annotando peso delle carni e lunghezza e peso delle conchiglie. Il campione ottenuto dalla dissezione deve essere conservato in congelatore a -18°C.

Il campione congelato può essere liofilizzato, a patto che si prendano precauzioni contro il reflusso dell'olio della pompa da vuoto nella camera di liofilizzazione. La liofilizzazione stabilizza il campione consentendo una più agevole conservabilità e facilita le operazioni di estrazione solido-liquido.

Le concentrazioni di IPA devono essere espresse sul peso umido e è, quindi, necessario nel caso si liofilizzi il campione, determinarne il contenuto d'acqua per poter poi convertire le concentrazioni da peso secco a peso umido.

2.3.5 Interferenze e cause di errore

È necessario verificare che i reagenti, i consumabili, la vetreria, le apparecchiature e la strumentazione impiegati non apportino interferenze nella determinazione degli analiti. Tale verifica deve essere effettuata al primo impiego dei suddetti materiali e durante tutto il periodo del loro utilizzo, inserendo l'analisi di bianchi di procedimento a ogni sequenza di estrazione. È della massima importanza selezionare solventi di elevata purezza e verificare che non apportino, in particolare dopo la loro concentrazione, interferenze significative nella determinazione.

Il sodio solfato e la silice, se utilizzata, devono essere purificati in muffola a 600°C per una notte e quindi conservati in essiccatore prima del loro utilizzo.

È preferibile evitare l'uso di plastiche al di fuori del PTFE, come anche impiegare filtri in fibra di vetro o di acciaio piuttosto che di cellulosa.

È necessario assicurare che il campione e, in particolare, l'estratto in solvente organico siano mantenuti al riparo dalla luce solare diretta allo scopo di evitare la fotodegradazione di alcuni analiti sensibili. In tal senso può essere utile l'impiego di vetreria ambrata e di fogli di alluminio.

Le interferenze cromatografiche devono essere attentamente valutate e le condizioni operative del rivelatore devono essere scelte in modo da massimizzare la selettività per l'analita ricercato (selezione ottimale delle lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione nel caso di determinazione in HPLC/FLD, selezione ottimale di ioni o transizioni, di energie di collisione, di dwell time nel caso di determinazione in GC/MS o GC/MS/MS).

Nel caso vengano determinati altri IPA oltre a quelli richiesti nel biota dal D.lgs. 172/2015 bisogna inoltre verificare che la risoluzione cromatografica di alcuni analiti con tempi di ritenzione vicini sia sufficiente per poter fornire un risultato come singolo analita ($R > 0.8$) o se non sia invece tale da dover riportare il risultato come somma di più analiti (ad esempio, in GC, la coppia fenantrene-antracene o il trio benzo [b]-benzo[j]- benzo[k]-fluorantene o l'interferenza sull'indeno [1,2,3-cd] pirene da parte del Dibenzo [a,h] antracene o di altri composti).

2.3.6 Estrazione e purificazione

Il campione, umido o liofilizzato, deve essere omogeneizzato e macinato. Il campione umido viene solitamente mischiato con sodio solfato anidro, terra di diatomee o altro materiale inerte che assorba l'acqua fino a ottenere una polvere priva di grumi. Il campione liofilizzato può essere estratto tal quale e generalmente non richiede la successiva disidratazione dell'estratto organico.

L'aliquota di campione sottoposto a estrazione non deve essere eccessiva rispetto alla capacità di rimozione delle interferenze, in particolare dei lipidi, da parte delle procedure di purificazione impiegate. In genere 1-2 g di campione liofilizzato o 5-10 g di campione umido costituiscono aliquote in grado di fornire la necessaria rappresentatività e sensibilità pur non eccedendo la capacità di purificazione delle normali procedure di *clean up*.

L'estrazione può essere eseguita mediante tecniche solido-liquido come estrazione con *soxhlet*, a fluido pressurizzato, assistita dalle microonde o da ultrasuoni, impiegando preferibilmente una miscela di solventi apolare e polare. L'estrazione può anche avvenire per saponificazione a caldo con una soluzione alcolica alcalina seguita da retroestrazione liquido-liquido con solvente apolare (o con una minima percentuale di solvente polare, ma poco miscibile con l'acqua come il diclorometano).

La purificazione può essere eseguita sia mediante cromatografia di adsorbimento, generalmente su gel di silice, sia mediante cromatografia di gel permeazione.

Nel caso s'impieghi un'estrazione a liquido pressurizzato è possibile eseguire una fase preliminare di purificazione contestuale all'estrazione, inserendo opportune quantità di adsorbente direttamente sul fondo della cella di estrazione. In questo caso è necessario verificare che la combinazione dei vari parametri (la composizione della miscela estraente, le condizioni operative relative a tempi, temperature, pressione e numero di cicli di estrazione e la quantità e l'attività dell'adsorbente impiegato) sia tale da garantire, oltre a un'efficace purificazione, anche un completo recupero degli analiti. Generalmente una miscela esano-diclorometano e un'aliquota di silice parzialmente disattivata con acqua forniscono buoni risultati.

Nel caso di *clean up* su colonne di silice questa deve essere accuratamente purificata prima dell'uso. Nel caso si impieghi un procedimento di purificazione della silice per estrazione con solventi deve essere attentamente verificata l'assenza di residui di contaminazione. In caso tale purificazione risulti non del tutto sufficiente a eliminare apporti di contaminazione si consiglia di tenere la silice (secca) per una notte in muffola a 600°C. La colonna di purificazione di silice deve essere sormontata da uno strato di sodio solfato anidro anch'esso purificato in muffola, lo strato di adsorbente deve essere ben condizionato in solvente realizzando un impaccamento omogeneo e privo di bolle d'aria e cammini preferenziali. Il campione viene caricato in estratto apolare e gli IPA vengono eluiti con una miscela circa 1:1 di esano e diclorometano. Nel

caso si effettui l'eluizione di una prima frazione di scarto con solvente apolare è necessario monitorare costantemente l'effettivo frazionamento degli IPA per non rischiare di scartare analiti che dovessero eventualmente eluire nella prima frazione.

La purificazione mediante Cromatografia di Gel Permeazione (GPC) è estremamente utile nel caso di campioni di biota che contengano elevate quantità di lipidi. Si presta a essere utilizzata come tecnica primaria di *clean up* nel caso di metodi analitici multicomponente in quanto, non basandosi su reazioni chimiche, non comporta rischi di perdita di analiti degradabili e è possibile applicarla a una amplissima varietà di analiti. La tecnica si basa sulla discriminazione dimensionale delle molecole per mezzo di un gel idrofobico poroso (stirene divinilbenzene).

Le colonne impiegate possono essere sia in vetro da impaccare a mano (operazione da svolgere con molta cura), sia in acciaio, già condizionate in fabbrica in uno specifico solvente. È molto importante assicurarsi che la fase stazionaria sia ben condizionata nello specifico solvente scelto e che così rimanga costantemente. I solventi impiegabili sono di diversa tipologia ma generalmente, dati i volumi di campione da iniettare, i flussi di lavoro sono dell'ordine dei 5 ml/min e le quantità di solventi consumate sono significative.

È consigliabile impiegare strumentazione specificamente dedicata alla GPC preparativa che, per via delle tipologie di solventi, dei flussi di lavoro, dei volumi di iniezione e di frazioni raccolte, presentano caratteristiche diverse rispetto a un HPLC analitico. Per poter eseguire in maniera automatizzata la purificazione di una serie di campioni è necessario dotarsi di un autocampionatore adatto alla GPC e di un raccogliore di frazioni.

È necessario individuare accuratamente la frazione (i tempi di raccolta dell'eluato) in cui vengono eluiti gli analiti sia impiegando miscele standard specifiche per GPC (disciolte nello stesso solvente o miscela di solventi in cui viene eseguita la tecnica), sia eseguendo prove di recupero relative alla sola fase di purificazione per GPC. È necessario verificare costantemente la stabilità dei tempi di eluizione (utile in questo senso la termostatazione della colonna) e è consigliabile lasciare un margine di sicurezza anche a fronte di una purificazione leggermente inferiore.

Il campione deve essere disciolto nel solvente usato per l'eluizione, deve essere filtrato a 5µm e non deve essere eccessivamente viscoso. Una prima frazione viene scartata e contiene i composti coestratti di maggiori dimensioni molecolari rispetto agli analiti (come i lipidi), mentre una seconda frazione, contenente i composti di interesse, viene raccolta e concentrata. È bene scartare la terza frazione che contiene composti più piccoli. Per rimuovere le interferenze residue ancora presenti nella frazione concentrata può essere applicata una tecnica di purificazione che si basa su un diverso principio, come l'adsorbimento su gel di silice, utile per rimuovere sostanze polari di dimensioni simili agli analiti, o può anche essere eseguita una seconda purificazione per GPC.

Per la determinazione di alcuni IPA nel biota sono impiegati anche metodi tipo QuEChERS.

Questi metodi generalmente prevedono la dispersione, eventualmente previa aggiunta di acqua, del campione umido finemente sminuzzato in una provetta usa e getta centrifugabile, l'estrazione degli analiti per dibattimento mediante aggiunta di un volume noto (che costituisce il volume finale dell'estratto) di un solvente organico miscibile con acqua, generalmente acetonitrile, l'aggiunta di sali per favorire la separazione della fase organica, il dibattimento e la centrifugazione.

Un'aliquota di fase organica viene prelevata, trasferita in una seconda provetta centrifugabile più piccola e sottoposta a un rudimentale trattamento di purificazione che può essere o un semplice congelamento seguito da centrifugazione per far precipitare la componente lipidica, o una *dispersive-SPE* (dibattimento dell'estratto con aliquota di adsorbenti solidi finemente suddivisi come C18 o PSA, ammina primaria e secondaria) seguita da centrifugazione. L'aliquota di estratto recuperabile, filtrata nel caso di analisi in HPLC, viene quindi sottoposta a determinazione strumentale.

I metodi di tipo QuEChERS sono sicuramente più rapidi e economici rispetto ai metodi tradizionali, tuttavia raggiungono una sensibilità molto inferiore per via dello sfavorevole rapporto tra massa del campione e volume finale dell'estratto (che coincide con il volume di acetonitrile aggiunto all'inizio del procedimento). Prima dell'impiego di metodi QuEChERS deve essere attentamente valutata la capacità del metodo, tenendo conto anche del recupero analitico che si riesce a ottenere, di soddisfare i requisiti del limite di quantificazione, in particolare per il benzo [a] pirene.

Esempio di metodo QuEChERS (ARPAL)

Si riporta di seguito un esempio di metodo QuEChERS, impiegato da ARPAL, applicabile alla determinazione di fluorantene e benzo [a] pirene nel biota:

- Estrazione: 3g di campione umido omogeneizzato viene trasferito in una provetta monouso da 50 ml
 - si aggiunge una barretta ceramica (per rompere agglomerati e mantenere omogeneo il campione)
 - si aggiungono 10 ml di acqua purificata e si pone su agitatore orizzontale per 15 minuti
 - si aggiungono 12 ml di acetonitrile e si pone su agitatore orizzontale per 15 minuti
 - si aggiungono 6 g MgSO₄ e 1.5 g di NaCl, si agita per 1 minuto
 - si centrifuga 10 minuti a 5000 giri
- Dispersive SPE: 4 ml del surnatante (acetonitrile) vengono trasferiti in provetta monouso da 15 ml contenente 400 mg di PSA, 400 mg di C18 *end capped*, 1200 mg MgSO₄
 - si agita per 1 minuto e si centrifuga 10 minuti a 3200 giri
- Filtrazione: circa 1.5 ml del surnatante purificato viene filtrato su membrane in PVDF con porosità 0.45 µm e trasferito in *vial* di vetro ambrato
- Analisi strumentale: HPLC/FLD con taratura a cinque punti da 0.225 ng/ml a 7.5 ng/ml (corrispondenti a 0.9 e 30 µg/kg p.u. nel campione di biota).

2.3.7 Determinazione strumentale

La determinazione strumentale può essere condotta mediante GC/MS (o GC/MS/MS) o HPLC/FLD. Impiegando metodologie tradizionali che prevedono estrazione e concentrazione dell'estratto, si raggiungono limiti di quantificazione dell'ordine di 1 µg/kg sul peso secco e quindi circa 0.25 µg/kg sul peso umido, ampiamente conformi ai requisiti determinati dai valori di SQA stabiliti dal D.lgs. 172/2015.

In generale, le metodiche di determinazione strumentale che impiegano la spettrometria di massa consentono l'uso di standard interni marcati isotopicamente in ragione di un composto marcato per ognuno degli analiti ricercati. Si raccomanda quindi questa pratica senza tuttavia prescindere dal raggiungimento di un adeguato recupero analitico.

Nel caso di determinazione strumentale effettuata mediante HPLC con rivelatore a fluorescenza l'uso di standard interni marcati isotopicamente per ogni analita può essere possibile in base all'effettiva capacità di risolvere cromatograficamente, nel tracciato della relativa lunghezza d'onda di emissione, lo standard marcato dall'analita nativo o da altri picchi presenti nel cromatogramma. In questo caso si raccomanda di impiegare tutti gli standard interni che risulta possibile quantificare con affidabilità e si segnala la possibilità di utilizzare, oltre che composti marcati col deuterio, anche IPA monofluorurati.

La tecnica GC/MS/MS è sicuramente adeguata alla determinazione degli IPA negli estratti di biota, ma anche la meno costosa GC/MS, in particolare a singolo quadrupolo che è il tipo di strumento più diffuso in campo ambientale, è generalmente in grado di soddisfare i requisiti, specialmente se vengono adottati accorgimenti per incrementare la sensibilità strumentale. La modalità di acquisizione dati dovrebbe essere SIM a meno che, per lo strumento specifico, la modalità SIM/SCAN non comporti alcuna perdita di intensità nei segnali degli ioni di interesse. È possibile adottare una modalità di iniezione di tipo *solvent vent* che consente l'introduzione di volumi di campione sensibilmente maggiori di quelli tipici della modalità splitless.

I parametri operativi dell'iniezione in modalità *solvent vent* devono essere accuratamente messi a punto. Le impostazioni dell'elettromoltiplicatore del rivelatore devono essere tali da incrementare il più possibile la risposta per gli analiti più impegnativi. In GC/MS devono essere monitorati almeno due ioni per ogni analita (due transizioni in GC/MS/MS) e i tempi di acquisizione (*dwell time*) degli ioni (o transizioni) devono essere stabiliti in modo tale che ogni picco sia disegnato da non meno di 7 punti.

Per compensare la scarsa intensità di alcuni ioni di conferma può essere utile incrementare, per questi, il *dwell time* nella misura in cui ciò non pregiudichi la frequenza di campionamento complessiva.

È consigliabile, nei limiti del raggiungimento della risoluzione cromatografica necessaria, impiegare un programma di riscaldamento del forno relativamente rapido in quanto gli analiti che eluiscono per ultimi tendono a avere una forma scodata che non favorisce la sensibilità analitica.

Si riportano di seguito alcuni esempi di condizioni operative strumentali, relative alle tre tecniche sopra richiamate, impiegabili per la determinazione di IPA.

Esempio di parametri di acquisizione SIM in GC/MS

In Tabella 15 si riportano esempi di ioni di quantificazione e di conferma per gli analiti e i rispettivi standard interni nel caso di determinazione in GC/MS in modalità SIM.

Tabella 15. Ioni di quantificazione e di conferma degli IPA.

Sostanza	Ione diagnostico		
	1 m/z	2 m/z	3 m/z
Antracene	178 (100)	176 (18)	76 (3)
Antracene-d10	188 (100)	184 (14)	
Fluorantene	202 (100)	200 (20)	100 (3)
Fluorantene-d10	212 (100)	208 (17)	
Benzo [a]pirene	252 (100)	250 (24)	113 (11)
Benzo [a]pirene-d12	264 (100)	260 (20)	

I numeri in parentesi indicano le intensità relative dello ione qualificatore rispetto allo ione principale; i numeri in corsivo indicano che spesso lo ione in questione non è presente.

Esempio di parametri di acquisizione MRM in GC/MS/MS

In Tabella 16 e Tabella 17 si riportano esempi di transizioni di quantificazione e, quando disponibili, di conferma per gli analiti e i rispettivi standard interni, nel caso di determinazione in GC/MS/MS in modalità MRM.

Tabella 16. Transizioni MRM per gli standard.

Sostanza	Ione padre	Ione figlio	Tensione cella coll. (V)
Antracene	178	176	34
Benzo [a]pirene	252	250	42
	252	248	40
Fluorantene	202	201	30
	202	200	50

Tabella 17. Transizioni MRM per gli standard interni.

Sostanza	Ione padre	Ione figlio	Tensione cella coll. (V)
Benzo[a]pirene D12	264.1	260	45
Fenantrene D10	188.1	184	25
Fluorantene D10	212.1	208	40

Esempio di parametri di acquisizione HPLC-FLD

Vengono di seguito riportate, a titolo di esempio, le condizioni operative per una determinazione strumentale in HPLC/FLD. Tali condizioni operative consentono la determinazione anche di altri IPA oltre a quelli richiesti dalla normativa nel biota.

L'analisi viene condotta in HPLC (Waters 600 con fluorimetro 2475 e PDA 2998). Il campione deve essere filtrato su membrane di porosità di 0.45µm o 0.20µm in PTFE o altro materiale inerte e non contaminante.

La colonna è la Waters PAH 250 x 4.6 mm, 5 µm, il gradiente utilizzato è il seguente:

- t = 0 min: 40% acqua, 60% acetonitrile;
- t = 12 min: 100% acetonitrile;
- t = 23 min: 100% acetonitrile;
- t = 28 min: 40% acqua, 60% acetonitrile.

L'analisi vera e propria si svolge in 25 minuti, tempo sufficiente per la completa risoluzione dei 16 IPA definiti prioritari dall'USEPA. L'eluizione del campione viene monitorata a 254 nm con il rivelatore PDA (a serie di diodi), mentre il detector a fluorescenza è programmato per variare le lunghezze d'onda di eccitazione e emissione in funzione del tempo di eluizione dei diversi IPA (Tabella 7).

Le concentrazioni delle soluzioni di taratura coprono l'intervallo 0.225-7.5 ng/ml che, nelle condizioni operative del metodo QuEChERS impiegato, corrispondono a 0.9-30 µg/Kg sul peso umido del campione.

2.3.8 Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

L'identificazione dell'analita avviene, in HPLC, in base alla individuazione del picco sullo specifico segnale di eccitazione/emissione, all'interno della finestra del tempo di ritenzione determinata dall'analisi di una soluzione standard, in GC/MS l'identificazione dell'analita avviene in base alla individuazione degli specifici ioni (o transizioni), nel caratteristico rapporto di intensità relative, all'interno della finestra del tempo di ritenzione determinata dall'analisi di una soluzione standard.

In GC/MS (e GC/MS/MS) la taratura viene effettuata mediante standard interni (selezionando il più simile all'analita tra quelli della miscela di standard interni impiegata), mentre in HPLC la taratura avviene mediante standard esterno. In GC/MS la regressione viene eseguita mettendo in relazione il fattore di risposta (rapporto fra aree e concentrazioni) dell'analita rispetto al suo standard interno usando l'area dello ione (o della transizione) primario. In HPLC la regressione viene eseguita mettendo in relazione l'area del picco dell'analita rispetto alla sua concentrazione. La linearità della regressione è considerata accettabile se superiore a 0.99.

La taratura deve coprire l'intero intervallo di concentrazioni da determinare. Concentrazioni sull'estratto del campione che risultassero superiori al punto più alto della taratura richiedono la diluizione dell'estratto e la rianalisi. Il punto più basso della taratura dovrebbe per lo meno corrispondere, in base al fattore di arricchimento fra campione e estratto, al LOQ richiesto per l'analita.

La determinazione dei recuperi viene fatta, in GC/MS dalla quantificazione degli standard interni sulla base della concentrazione nota dello standard di siringa (standard interno di iniezione) aggiunto all'estratto alla fine del procedimento di estrazione e prima della determinazione strumentale.

La determinazione dei recuperi in HPLC viene fatta quantificando, mediante taratura con standard esterni, gli standard surrogati (IPA deutерati o IPA fluorurati) aggiunti al campione all'inizio del procedimento di estrazione.

I risultati, espressi in µg/kg sul peso umido del campione, dovrebbero essere espressi con due cifre significative.

È responsabilità del laboratorio dimostrare inizialmente e verificare durante l'applicazione che la metodologia prescelta consenta di raggiungere le prestazioni analitiche prescritte riguardo al limite di quantificazione e all'incertezza. In particolare è responsabilità del laboratorio verificare che l'insieme delle procedure di pretrattamento del campione, di estrazione, di purificazione, di concentrazione dell'estratto e di determinazione strumentale impiegate sia in grado di identificare e quantificare in maniera affidabile e ripetibile gli analiti, in matrice, alle concentrazioni richieste dai limiti normativi.

Nella verifica iniziale del metodo, il laboratorio deve effettuare una valutazione sperimentale almeno dei recuperi e della precisione a concentrazioni diverse, in particolare a quelle corrispondenti al LOQ e allo SQA

Nel corso delle analisi dei campioni ambientali il laboratorio deve impiegare strumenti di assicurazione della qualità del dato che comprendano, come minimo:

- l'esecuzione a ogni *batch* di estrazione di:
 - bianco di procedimento,
 - bianco fortificato o campione fortificato,
 - repliche in numero non inferiore a una per ogni 10 campioni e
 - l'uso, per tutti i campioni, di standard aggiunti in quantità nota (siano essi standard interni o surrogati) per la valutazione del recupero;
- l'analisi, a ogni *batch* di determinazione strumentale (almeno all'inizio e alla fine, preferibilmente anche durante) di:
 - standard per la verifica della validità della taratura (sia a alte che basse concentrazioni)
 - bianchi strumentali.

Il laboratorio deve partecipare a esercizi di confronto interlaboratorio sulla matrice specifica per gli analiti specifici. È particolarmente raccomandata anche l'analisi, ogni volta che sia possibile, di campioni di riferimento del laboratorio, cioè di matrici reali con concentrazioni note degli analiti. Tali campioni di riferimento possono essere materiali di riferimento certificati, o possono essere residui di campioni oggetto di esercizi di *proficiency testing* per i quali sono disponibili valori assegnati per i misurandi, o campioni reali, sufficientemente omogenei e stabili, che il laboratorio ha ben caratterizzato avendoli ripetutamente analizzati nel tempo.

Il laboratorio deve adottare dei criteri di accettabilità per i parametri relativi al controllo di qualità quali il recupero degli standard interni o surrogati nei campioni incogniti, il recupero degli analiti nel campione fortificato, l'entità di concentrazioni accettabili nel bianco di procedimento e nei bianchi strumentali, l'entità dello scostamento fra le repliche, lo scostamento degli standard di verifica di validità della taratura dai valori nominali, il rapporto di intensità tra ione primario e ione qualificatore, ecc. Inizialmente i valori dei criteri di accettabilità possono essere stabiliti a priori (ad esempio un intervallo 60-120% per i recuperi, un $\pm 20\%$ sulla concentrazione nominale degli standard, ecc.), mentre successivamente, possono essere calcolati dall'analisi dei dati sul controllo qualità prodotti durante un significativo periodo di tempo. In questo modo possono essere stabiliti criteri più realistici e specifici per il laboratorio ad esempio mediante la costruzione e l'aggiornamento di carte di controllo, strumenti in grado di evidenziare eventuali tendenze o deviazioni dal normale funzionamento del metodo.

3. METALLI

A cura di Maria Teresa Berducci, Chiara Maggi

3.1 Determinazione metalli in acque marine

Sulla base dei dati raccolti dal Gruppo di Lavoro 4 del SNPA, come riportato nel volume “Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine - Verifica delle metodologie ufficiali esistenti e la loro applicabilità alle matrici marine”, è stato possibile avere un quadro completo delle metodologie impiegate dalle varie Agenzie e dei relativi limiti di quantificazione.

Le criticità riscontrate nella determinazione di cadmio, nichel, piombo e mercurio nelle acque marine, comuni alla gran parte dei laboratori, sono legate alle basse concentrazioni degli SQA, che richiedono il raggiungimento dei LOQ che vanno oltre le possibilità delle tecniche di determinazione strumentale tradizionalmente impiegate.

In Tabella 18 vengono riportati gli SQA e i LOQ richiesti dal D.lgs. 172/2015 per ciascun analita.

Tabella 18. SQA e LOQ richiesti per la determinazione dei metalli nelle acque marine.

Sostanza	SQA (µg/l)	LOQ (µg/l)
cadmio e composti	0.2	0.06
mercurio e composti	0.07 CMA **	0.02
nichel e composti	8.6	2.6
piombo e composti	1.3	0.4

*Limite di quantificazione ai sensi del D.lgs. 219/2010 (2009/90/CE e 2008/105/CE)

** Valore della Concentrazione massima ammissibile (CMA) del Hg in acqua di mare.

È opportuno ricordare che nel D.lgs. 172/2015 non è più riportato lo standard di qualità del mercurio in acqua, è rimasta infatti solo la determinazione della CMA, mentre è divenuta obbligatoria la determinazione del mercurio nella matrice biota. In ogni caso per verificare l'eventuale superamento della CMA in acqua è necessario definire una metodologia per la determinazione del mercurio anche in questa matrice.

3.1.1 Ricognizione metodologie ufficiali esistenti

I nuovi SQA introdotti dal D.lgs. 172/2015 hanno determinato un abbassamento dei LOQ e di conseguenza hanno comportato l'adeguamento da parte di molte Agenzie delle metodologie analitiche. In base ai dati aggiornati a marzo 2016 vi sono n. 38 conformità al LOQ e n. 14 non conformità, queste ultime si riferiscono principalmente alla determinazione di cadmio e mercurio.

Solo cinque Agenzie riescono a raggiungere la conformità per tutti gli analiti. Le metodiche analitiche adoperate per la determinazione di cadmio, nichel e piombo prevedono la determinazione strumentale mediante spettrometria di emissione con plasma induttivamente accoppiato e spettrometria di massa (ICP-MS). Solo un'Agenzia raggiunge il LOQ richiesto per la determinazione del cadmio adoperando una tecnica di preconcentrazione del campione, seguita da una determinazione strumentale mediante ICP-OES.

Relativamente alla determinazione del mercurio, nel D.lgs. 172/2015 permane l'esigenza di raggiungere un LOQ estremamente basso legato alla necessità di determinare SQA-CMA pari a 0.07 µg/l.

I laboratori delle Agenzie adoperano metodiche analitiche differenti, senza evidenziare particolari criticità. Alcune Agenzie utilizzano tecniche di pretrattamento ossidativo seguite dalla determinazione con spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) o spettrometria di assorbimento atomico con concentrazione su amalgama (DMA-80); altre utilizzano la spettrometria di fluorescenza atomica abbinata alla tecnica dei vapori freddi (CV-AFS); altre ancora la determinazione strumentale mediante spettrometria di emissione con plasma induttivamente accoppiato e spettrometria di massa (ICP-MS).

Dalla ricognizione effettuata, si evidenzia che i procedimenti analitici più idonei all'analisi dei metalli in tracce nelle acque marine, tenendo conto degli SQA normativi da raggiungere e delle basse concentrazioni riscontrate mediamente in tale matrice, sono quelli che prevedono l'impiego di strumenti altamente sensibili per i quali non è richiesto di effettuare pretrattamenti del campione. Viceversa la preconcentrazione risulta indispensabile per aumentare la sensibilità strumentale e minimizzare gli effetti negativi dovuti a potenziali interferenti e alla matrice stessa, qualora si voglia determinare tali elementi con strumentazioni meno sensibili. Tuttavia, in questo secondo caso, i risultati non sono soddisfacenti non riuscendo a raggiungere le prestazioni richieste.

Si riporta una panoramica dei metodi ufficiali esistenti sia a livello nazionale che internazionale (Tabella 19). Di seguito vengono descritte le metodiche che permettono di raggiungere le prestazioni richieste dalle normative di settore.

Tabella 19. Metodologie ufficiali nazionali e internazionali per la determinazione dei metalli.

Determinazione strumentale	LOQ	Matrice	Strumentazione
UN EN ISO 11885:2000 (rev.2009)	0.2- 5 µg/l	Acqua	ICP-OES
EN ISO 17294-2:2004 (rev.2016)	0.002 -1 µg/l	acqua, sedimenti mineralizzati e rifiuti mineralizzati	campioni ICP-MS
UN EN ISO 17852 (rev.2008)	10 ng/l	Acque	AFS (Hg)
UN EN ISO 12846 (rev.2013)	0.01-0.05 µg/l	Acque	AAS (Hg)
UN EN ISO 15586:2003	0.4-10 µg/l	acque e campioni mineralizzati	GT-AAS
EPA 6020b:2014	<0.1- 1 µg/l	acqua, sedimenti mineralizzati	campioni ICP-MS
UN EN ISO 5961:1997	0,3 µg/l	acque	AAS (Cd)
EPA 6010c:2014	0,1-5 mg/l	acque e campioni mineralizzati	ICP-OES
EPA 7131A:1994	0.5 µg/l	acque e campioni mineralizzati	AAS (Cd)
EPA 7421:1994	5 µg/l	acque e campioni mineralizzati	GT-AAS (Pb)
EPA 7060: 1994	5 µg/l	acque e campioni mineralizzati	GT-AAS (As)
EPA 7000B: 1992	mg/l	acque e campioni mineralizzati	F-AAS
EPA 7474: 2007		sedimenti e campioni di biota	AFS (Hg)
EPA 7473:2007	0.05 µg/l	acque e solidi	DMA AAS (Hg)
EPA 7199: 1996	0.9-1.2	acque e campioni mineralizzati	cromatografia ionica
EPA 7196A: 1992	0.5 mg/l	acque e campioni mineralizzati	colorimetria (Cr VI)
APHA methods	0.005 µg/l	acqua, sedimenti e campioni	ICP-MS
IRSA-CNR-APAT	0.1 µg/l	tutti tipi di acque	CV-AAS

3.1.2 Metodologia per la determinazione di Cd, Ni, Pb e Hg con ICP-MS

La spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) è applicabile alla determinazione di concentrazioni sub-µg/l di Cd, Ni, Hg e Pb (come di un gran numero di altri elementi) in campioni di acqua marina. Non è richiesto alcun pretrattamento, il contenuto totale è determinato sul campione di acqua precedentemente filtrato e acidificato.

L'impiego di un metodo che permetta la determinazione simultanea di un numero elevato di elementi unita alla buona sensibilità legata all'accoppiamento di un rivelatore di massa al sistema di atomizzazione in plasma, e alla buona precisione ottenibile dalle analisi, hanno favorito l'ampia diffusione di questi strumenti; essi sono a oggi la via migliore da percorrere al fine di ottenere la conformità ai requisiti di prestazione analitica richiesti dalla normativa. Tuttavia l'applicazione di tale metodologia comporta un certo livello di investimento economico iniziale richiesto per l'acquisto dello strumento, insieme alla predisposizione del laboratorio e alla formazione degli addetti.

Principio del metodo

La tecnica ICP-MS sfrutta la capacità del plasma, mantenuto a altissime temperature attraverso un generatore di radiofrequenze, di produrre ioni. Gli ioni prodotti nel plasma vengono ordinati in base ai loro rapporti rapporto massa/carica mediante un quadrupolo e quantificati con un moltiplicatore di elettroni.

Il campione liquido viene convertito in aerosol, attraverso un nebulizzatore, e analizzato.

Le possibilità che vengono offerte con questa metodica sono:

- grande sensibilità e ampio intervallo dinamico di lavoro (concentrazioni dai ng/l ai mg/l);
- contemporanea determinazione di analiti;
- elevato grado di automazione;
- possibilità di determinare la distribuzione isotopica degli elementi.

Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione degli analiti in esame in campioni di acqua marina nell'intervallo di concentrazione utile al fine del rispetto dei requisiti del D.lgs. 172/2015. Per concentrazioni superiori si può ricorrere alla diluizione del campione.

Il più basso limite di quantificazione e il range lineare varia con la matrice, la strumentazione e le condizioni operative. Per l'acqua marina si può arrivare a LOQ inferiori a 0.01µg/l.

Campionamento e conservazione del campione

Le procedure di campionamento sono di pertinenza del committente per il quale il Laboratorio predispone apposite procedure per il corretto campionamento e i contenitori idonei. I contenitori adatti per Cd, Pb e Ni sono in polietilene o polipropilene in quanto su altri tipi di plastica la concentrazione degli elementi, eventualmente disciolti nel campione, varia piuttosto rapidamente a causa di fenomeni di adsorbimento e desorbimento degli stessi. Per il Hg, si devono utilizzare i contenitori recipienti in vetro Pyrex (boro-silicato).

Il campione per la determinazione di Cd, Pb e Ni viene acidificato con acido nitrico suprapuro per stabilizzare gli elementi da determinare (previa eventuale filtrazione in campo con filtri di cellulosa a 0.45µm o con filtri con materiali alternativi, dotati di certificato per l'analisi dei metalli), conservato a +4°C e analizzato entro 6 mesi.

Per il Hg è necessario aggiungere al campione raccolto acido cloridrico suprapuro in quantità compresa tra 0.5 e 2%.

Interferenze e cause di errore

Solventi, reagenti e contenitori per la preparazione possono addurre interferenze alla procedura di analisi. Tutti i materiali devono essere testati al fine di dimostrare di essere privi di interferenti sotto le condizioni di analisi. Tale verifica deve essere effettuata al primo impiego dei suddetti materiali e durante tutto il periodo del loro utilizzo, inserendo l'analisi di bianchi di procedimento a ogni sequenza di analisi. È della massima importanza selezionare solventi di elevata purezza e verificare che non apportino interferenze significative nella determinazione.

Alcuni strumenti riescono attraverso accorgimenti del software (tipo diluizione *on line*) a diminuire le interferenze legate alla complessità della matrice.

Il controllo di qualità può essere soggetto a errori sistematici per alcuni elementi (come il mercurio) che vengono addizionati di volta in volta al multistandard di controllo qualità in quanto poco stabili nel tempo.

Determinazione strumentale

La determinazione strumentale dei metalli in acqua di mare condotta mediante ICP-MS è indispensabile per gli analiti con maggiori requisiti di sensibilità, al fine del completo raggiungimento della conformità.

Lo spettrometro ICP-MS con sistema di dati permette correzioni di interferenze isobariche e l'applicazione della tecnica standard interno. Si utilizza un regolatore flusso di massa per nebulizzare l'argon e si raccomanda una pompa peristaltica per la soluzione campione. Viste le interferenze poliatomiche presenti nella matrice si consiglia l'utilizzo di un gas di reazione/collisione, eliminando la necessità di equazioni di correzione interferenze inaffidabili.

Il flusso di gas Argon deve essere di elevata purezza (99.99%).

In generale per l'analisi di campioni di acqua di mare in ICP-MS, è necessaria la diluizione del campione prima dell'analisi strumentale, di un fattore almeno pari a 10, in quanto l'alta concentrazione di sali potrebbe creare dei depositi nel sistema di introduzione del campione e nella zona dell'interfaccia. Tale accorgimento può non essere osservato se si dispone di uno strumento dotato di un sistema di diluizione liquida dei campioni automatizzato prima dell'analisi. Questo sistema riduce il rischio di contaminazione del campione, gli errori di diluizione e il tempo di preparazione del campione. Dalla ricognizione delle metodologie usate dalle diverse Agenzie, si è visto che solo attraverso tale accorgimento si è raggiunto facilmente il LOQ previsto per l'adempimento del decreto legislativo.

Attrezzature per le analisi

- Provette e matracci in polietilene o polipropilene. Questo materiale non mostra significative alterazioni della matrice.
- Pipette a volume variabile di varia capacità dedicate.

Reagenti e standard

Gli acidi, sia quelli usati per la preparazione del campione che quelli per i lavaggi dello strumento, devono essere di purezza elevata. Questa accortezza è fondamentale in considerazione dell'elevata sensibilità dello strumento. È sconsigliato la lettura di soluzioni con acidità superiore al 2% (v/v) per minimizzare i danni all'interfaccia, almeno che non si disponga di uno strumento dotato di un'interfaccia costituito da materiale resistenti a percentuali di acidità superiori, e per ridurre al minimo le interferenze isobariche molecolari degli ioni di litio con gli analiti. Si deve in tutti i modi evitare la presenza di HF nelle soluzioni di campioni. Anche l'acqua utilizzata deve essere ultrapura, priva di interferenze.

Per quanto riguarda le Soluzioni Standard certificate, si considerano solo soluzioni madre standard di elevata purezza ($\geq 99.99\%$).

Le soluzioni di calibrazione devono essere preparate per diluizione dalle soluzioni standard concentrate di ogni analita in esame a diverse concentrazioni per coprire l'intervallo lineare dello strumento, considerando sempre un'acidità di circa 1% di HNO_3 . Di norma, le soluzioni utilizzate per la costruzione della retta di taratura sono ottenute attraverso la diluizione delle soluzioni standard da 100 $\mu\text{g/l}$, approssimativamente all'1% di HNO_3 .

È raccomandato l'uso di uno standard interno di opportuna concentrazione.

La soluzione di standard interni, a seconda dello strumento, può essere aggiunta in linea al momento dell'analisi utilizzando un secondo canale della pompa peristaltica e un collettore di miscelazione appropriato. È necessario un appropriato standard interno per ogni analita ricercato. Gli standard interni devono essere elementi contenuti a livelli trascurabili nel campione di prova e devono avere proprietà chimico-fisiche (es. massa ed energia di ionizzazione) il più possibile simili a quelle dell'elemento da determinare. Gli standard interni raccomandati sono quelli con massa atomica simile all'analita ricercato, di norma si utilizza una soluzione dei seguenti: ^6Li , ^{45}Sc , ^{89}Y , ^{103}Rh , ^{115}In , ^{159}Tb , ^{165}Ho e ^{209}Bi . Di norma si consiglia una concentrazione dello standard interno a concentrazione sufficientemente alta da ottenere una buona precisione sul segnale.

Relativamente ai Bianchi, ne sono necessari due tipi: il bianco di taratura che è usato nella costruzione della curva di taratura (consiste in una soluzione di acqua ultra pura con la stessa combinazione e concentrazione degli acidi impiegati per preparare le soluzioni di taratura) e il bianco di lavaggio che è usato per evitare contaminazioni tra i campioni e gli standard (consistente in una soluzione al 2% di HNO_3). Per l'analisi del mercurio è opportuno che il bianco di lavaggio contenga anche HCl con una concentrazione compresa tra 0.5 e 2% oppure una soluzione di 2 mg/ml di AuCl_3 .

Sono ritenuti bianchi valori di concentrazioni dell'analita in esame non superiori a $\frac{1}{2}$ LOQ.

Si deve porre attenzione a controllare le contaminazioni legate all'effetto memoria e/o ai fenomeni di contaminazione incrociata che si possono verificare se si analizzano sequenzialmente campioni e/o standard con grandi differenze di concentrazioni. Il periodo di lavaggio tra campioni deve essere sufficientemente lungo per eliminare tale fenomeni.

Infine, per la calibrazione dello strumento, si deve utilizzare una soluzione di *tuning*, contenente le masse degli elementi di interesse, per verificare che lo strumento funzioni correttamente in tutto il range di acquisizione. Questa soluzione è anche utilizzata per verificare che lo strumento abbia raggiunto la stabilità termica.

Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

La curva di taratura di tipo lineare deve soddisfare i requisiti del D.lgs. 219/2010 (2009/90/CE e 2008/105/CE) e deve essere adeguata a ricercare concentrazioni inferiori o pari al 30% dello SQA dell'analita in esame. Una volta costruita si deve verificare quotidianamente, prima di ogni corsa analitica, la correttezza della curva attraverso un bianco di taratura e più punti della curva.

Il software dello strumento determina i numeri di conteggi e la concentrazione dei diversi elementi in ogni campione. Il software permette di eseguire la taratura, la correzione sul bianco, la correzione dei conteggi con le equazioni di correzione, determinare la concentrazione degli analiti nelle soluzioni, segnalare le anomalie rispetto ai criteri di controllo stabiliti.

La taratura deve coprire l'intero intervallo di concentrazioni da determinare; qualora le concentrazioni misurate risultassero superiori al punto più alto della taratura è necessario procedere alla diluizione dell'estratto e alla nuova analisi. Il punto più basso della taratura invece dovrebbe per lo meno corrispondere al LOQ richiesto per l'analita.

È responsabilità del laboratorio dimostrare inizialmente e verificare durante l'applicazione che la metodologia prescelta consenta di raggiungere le prestazioni analitiche prescritte riguardo al LOQ e all'incertezza. In particolare è responsabilità del laboratorio verificare che l'insieme delle procedure impiegate per l'estrazione del campione, la purificazione e la concentrazione dell'estratto, la determinazione strumentale siano in grado di identificare e quantificare in maniera affidabile e ripetibile gli analiti alle concentrazioni richieste dai limiti normativi.

Nella verifica iniziale del metodo il laboratorio deve effettuare una valutazione sperimentale almeno dei recuperi e della precisione a concentrazioni diverse, in particolare a quelle corrispondenti al LOQ e allo SQA.

Una volta alla settimana deve essere controllata la sensibilità e la stabilità del sistema usando soluzioni di ottimizzazione fornite dalla ditta costruttrice dello strumento. Per routine giornaliera, si tara lo strumento mediante un bianco, il livello di taratura più alto e ancora due o tre punti di taratura intermedi. Subito dopo la taratura si analizza un bianco reagenti per controllare gli eventuali effetti memoria e un campione di controllo qualità. Quindi si analizzano i campioni.

Generalmente ogni 10-20 campioni viene inserito nuovamente un campione di controllo qualità per verificare il mantenimento della taratura. Insieme alla lettura delle soluzioni standard e ai campioni si deve leggere la soluzione contenente uno o più standard interni che consentono di controllare la sensibilità dello strumento durante la fase analitica e correggere le fluttuazioni. Si possono utilizzare delle equazioni per correggere eventuali interferenze. Tutte le operazioni vengono gestite dal software certificato dello strumento.

Ogni laboratorio deve mantenere un programma atto all'assicurazione della qualità.

La precisione deve essere verificata inizialmente mediante analisi della ripetibilità sul bianco e sugli standard usati per la taratura. La precisione deve essere valutata mediante delle prove di recupero sugli standard a diversa concentrazione.

A ogni sequenza analitica strumentale o almeno ogni dieci campioni dovrebbero essere effettuati un bianco di procedimento, una prova di recupero e, se possibile, una replica di un campione.

Gli standard di verifica della taratura dovrebbero dare uno scostamento massimo inferiore al 20% della concentrazione nominale; i bianchi, strumentali e di procedimento, dovrebbero dare risultati inferiori ai LOQ relativi a ciascun analita.

Al fine della determinazione della precisione è auspicabile l'utilizzo di materiali di riferimento certificati con matrice simile a quella in esame. È bene notare che i materiali di riferimento disponibili per le acque marine sono in numero esiguo e presentano spesso concentrazioni addirittura inferiori ai LOQ richiesti, rendendo difficile il loro utilizzo.

I risultati devono essere espressi in $\mu\text{g/l}$ con il numero di cifre significative richiesto dal metodo di analisi impiegato.

Il laboratorio dovrebbe partecipare a esercizi di confronto interlaboratorio sulla matrice specifica per gli analiti specifici.

Il laboratorio deve adottare dei criteri di accettabilità per parametri relativi al controllo di qualità quali il recupero degli standard interni o surrogati nei campioni incogniti, il recupero degli analiti nel campione fortificato, l'entità di concentrazioni accettabili nel bianco di procedimento e nei bianchi strumentali, l'entità dello scostamento fra le repliche, lo scostamento degli standard di verifica di validità della taratura dai valori nominali, ecc.

Inizialmente i valori dei criteri di accettabilità possono essere stabiliti a priori (ad esempio un intervallo 60-120% per i recuperi, un $\pm 20\%$ sulla concentrazione nominale degli standard, ecc.), mentre successivamente essi possono essere calcolati dall'analisi dei dati sul controllo qualità prodotti durante un significativo periodo di tempo. In questo modo possono essere stabiliti criteri più realistici e specifici per il laboratorio ad esempio mediante la costruzione e l'aggiornamento di carte di controllo, strumenti in grado di evidenziare eventuali tendenze o deviazioni dal normale funzionamento del metodo.

3.1.3 Metodologia per la determinazione di Hg con CV-AFS

L'analisi del mercurio ha sempre richiesto abilità e accuratezza operativa. Tra gli aspetti che rendono delicata l'analisi del mercurio vi è la risposta analitica di questo elemento che richiede procedure dedicate, anche in sistemi simultanei, e molto spesso impone l'utilizzo di kit specifici. Tutto questo è ancora più critico se il mercurio deve essere determinato in tracce o ultra-tracce, come nel caso della determinazione nelle acque marine, con concentrazioni che possono essere inferiori al ng/l .

Per questo motivo spesso si preferisce adoperare una metodica specifica per la sua determinazione, invece di usufruire di una metodica multicomponente. Disporre di uno strumento dedicato può semplificare molto la routine analitica e l'analisi, in questo modo, risulta molto più rapida e meno problematica.

Con la spettrometria di fluorescenza atomica viene misurata la fluorescenza emessa dal campione, la cui intensità è direttamente proporzionale all'intensità della sorgente.

Principio del metodo

Il mercurio viene ossidato a mercurio divalente per aggiunta di BrCl . Si eliminano i cloruri in eccesso con una soluzione di cloruro di idrossilammina ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$). Tutto il mercurio bivalente viene ridotto a mercurio elementare per addizione al campione di SnCl_2 .

Mediante la tecnica *purge and trap* con azoto o argon, i vapori di mercurio elementare vengono preconcentrati (secondo il principio dell'amalgama con l'oro) su una trappola contenente quarzo ricoperto di oro. Successivamente, per desorbimento termico della trappola (campione), i vapori di mercurio vengono trasportati nella linea analitica da un flusso di argon (*carrier gas*) e amalgamati nuovamente su una seconda trappola (analitica). Si procede successivamente al desorbimento termico di quest'ultima e il mercurio trasportato dal *carrier* nella cella di misura viene rilevato mediante fluorescenza atomica CV-AFS (*Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry*).

L'azoto o l'argon utilizzato per il *purge and trap* del campione deve essere di elevato grado di purezza e eventuali tracce di mercurio presenti devono essere eliminate mediante una trappola d'oro inserita sulla linea del gas prima dell'ingresso nel gorgogliatore.

Campo di applicazione

Il metodo permette la determinazione del mercurio nell'intervallo di concentrazione utile al fine del rispetto dei requisiti del D.lgs. 172/2015, di norma 0.5-100 ng/l. Per concentrazioni superiori a 100 ng/l è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione. Il limite di rilevabilità dello strumento (LOD) è < 0.1 ng/l.

Campionamento e conservazione del campione

L'analisi per la determinazione del mercurio totale prevede la raccolta del campione (100-2000 ml) in contenitori di Teflon o di borosilicato utilizzando le tecniche ritenute più idonee atte a evitare la contaminazione del campione. Il campione deve essere conservato a +4°C e analizzato entro 6 mesi.

Interferenze e cause di errore

Si devono evitare contaminazioni nel corso del processo di campionamento e di analisi.

Determinazione strumentale

Lo spettrometro deve essere equipaggiato con un rivelatore a fluorescenza atomica munito di *mass flow controller* per il gas (CV-AFS), nel caso in cui il rivelatore non ne sia provvisto, deve essere utilizzato un Mass Flow Controller. Necessità di flusso di gas argon 5.0 e di gas azoto 5.0.

Reagenti e standard

Tutti i reattivi, l'acqua utilizzata per il lavaggio della vetreria e dei materiali utilizzati per la preparazione delle soluzioni devono essere a elevato grado di purezza: l'acqua deve essere ultrapura, priva di interferenze e l'acido cloridrico, se possibile ultra-puro per il mercurio (< 5 pg/l), altrimenti per analisi in tracce. Per quanto riguarda gli altri reagenti, di seguito è riportata la loro preparazione.

Idrossilammina-cloridrato: 300 ng di NH₂OH-HCl portati a 1 l di volume con acqua ultrapura. La soluzione viene purificata aggiungendo 1 ml di SnCl₂ e sottoposta a *purging* per 12 ore in corrente di N₂ Hg-free (interponendo nella linea una colonnina di quarzo riempita con oro). Si conserva in bottiglia di Teflon.

Cloruro stannoso: 200 g di SnCl₂·2H₂O + 100 ml di HCl concentrato portato a 1 l di volume finale con acqua ultrapura. La soluzione viene purificata per 12 ore in corrente di N₂ Hg-free (interponendo nella linea una colonnina di quarzo riempita con oro). Si conserva in bottiglia di Teflon ben chiusa.

Cloruro di bromo: lavorando con attenzione sotto cappa si sciolgono 27 g di KBr in 2.5 l di HCl concentrato. Si pone in agitazione per circa 1 ora. Successivamente si aggiungono con estrema cautela 38 g di KBrO₃ tenendo la soluzione risultante sempre sotto agitazione. Alla fine dell'aggiunta la soluzione dovrebbe virare da giallo a rosso arancio. Si chiude il contenitore debolmente e si lascia sotto agitazione per un'altra ora. Si conserva in bottiglia di Teflon ben chiusa.

Soluzione standard di mercurio: si considerano solo soluzioni madre standard (10000 mg/kg) in soluzione acquosa, di elevata purezza (≥ 99.99%).

Le soluzioni di calibrazioni devono essere preparate per diluizione dalle soluzioni standard concentrate di ogni analita in esame a diverse concentrazioni per coprire l'intervallo lineare dello strumento.

Procedimento

Per la determinazione della fase disciolta il campione viene filtrato direttamente in campo al momento del prelievo (0.45 µm) e addizionato con un'aliquota adeguata di HCl₁₂N o di BrCl (500 µl ogni 100 ml). Dopo l'ossidazione (almeno 24 ore) il campione è addizionato con NH₂OH-HCl allo scopo di eliminare l'eccesso di alogeni. Chiudere il contenitore e agitare sino a scomparsa del colore giallo. Attendere il completamento della reazione per 5 minuti agitando periodicamente e assicurandosi che non sia rimasta più traccia di

alogeni. Connettere una trappola in oro al *bubbler* contenente il campione e aggiungere 0.5 ml di SnCl₂. Mettere il tutto in *purging* in corrente di N₂ a 350 ± 50 ml/min per 20 minuti.

In tal modo si ottiene la conversione di Hg (II) alla forma volatile Hg (0). Il Hg (0) viene separato dalla soluzione mediante strippaggio in corrente di azoto e raccolto su trappola in oro. Segue il desorbimento termico dalla trappola in oro e il trasporto mediante corrente di argon in cella a fluorescenza (CV-AFS) per la determinazione finale.

Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

La curva di taratura di tipo lineare deve soddisfare i requisiti del D.lgs. 219/2010 (2009/90/CE e 2008/105/CE) e essere adeguata a ricercare concentrazioni inferiori o pari al 30% dello SQA dell'analita in esame.

La curva di calibrazione viene costruita con un minimo di 5 punti escluso lo zero e deve contenere i risultati di 3 bianchi. Gli standard si analizzano per addizione di aliquote crescenti a partire dalla soluzione di mercurio standard direttamente dentro i *bubblers* di riduzione.

Dopo aver calcolato il valore medio dell'area relativo a ogni punto, si calcola la regressione lineare dei punti per stabilire l'R², che deve essere pari o superiore a 0.99 e ogni punto della curva non deve discostare più del 5% del suo valore reale. Una volta costruita si deve verificare quotidianamente, e prima di ogni corsa analitica, la correttezza della curva attraverso un bianco di taratura e più punti della curva.

Ogni dieci campioni è consigliabile effettuare degli standard di controllo posizionando una trappola pulita nella linea analitica e iniettando uno standard. Se il valore dello standard si discosta di oltre il 5% dal valore iniziale della curva di calibrazione, significa che la sensibilità dello strumento è cambiata e quindi si deve ricalcolare la curva. Il software permette di eseguire la taratura e determinare la concentrazione degli analiti nelle soluzioni.

Ogni laboratorio deve mantenere un programma atto all'assicurazione della qualità. Nella verifica iniziale del metodo il laboratorio deve effettuare una valutazione sperimentale almeno dei recuperi e della precisione a concentrazioni diverse, in particolare a quelle corrispondenti al LOQ e allo SQA.

La precisione deve essere verificata inizialmente mediante analisi della ripetibilità sui livelli di bianco, e sugli standard usati per la taratura.

3.1.4 Metodologia per la determinazione del Hg con CV-AAS

La spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) rappresenta ancora la tecnica più conveniente e diffusa per la determinazione del mercurio.

Il Hg (II) ottenuto dal trattamento preliminare di ossidazione del campione viene ridotto a mercurio elementare, vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa e quindi trasferito mediante un gas inerte nella cella di misura.

Principio del metodo

Il mercurio viene determinato mediante spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) alla lunghezza d'onda di 253.7 nm utilizzando due possibili configurazioni strumentali: sistema "*batch*" oppure "*flow injection*".

Il metodo si avvale di una ossidazione chimica in forno a microonde in cui avviene la decomposizione della sostanza organica e dei composti organomercurici (eventualmente presenti) e la trasformazione di tutto il mercurio presente a mercurio (II).

Successivamente il mercurio (II), ridotto dal sodio boroidruro a mercurio elementare, viene vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa e quindi trasferito mediante un gas inerte nella cella di misura.

Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del mercurio totale in campioni di acque di scarico e naturali (dolci e di mare) nell'intervallo di concentrazione da 0.5 a 50 µg/l. Per concentrazioni superiori a 50 µg/l è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione. Il limite di rilevabilità dello strumento (LOD) è pari a 0.02 µg/l.

Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati considerando le basse concentrazioni da determinare, di conseguenza, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene o policarbonato o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO₃ 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua a elevato grado di purezza.

In particolare, i campioni debbono essere filtrati su membrana da 0.45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e successivamente si deve aggiungere HNO₃ per stabilizzare la soluzione.

L'analisi deve essere effettuata il prima possibile poiché il campione acidificato rimane stabile per una settimana dal prelievo. Per una lunga conservazione del campione si consiglia di acidificare come descritto in precedenza e quindi congelare.

Interferenze e cause di errore

Sostanze organiche volatili, eventualmente presenti, possono essere eliminate nella fase di “*stripping*” che precede la riduzione. In tale fase viene eliminato anche l'eventuale cloro che può essere presente. La incompleta eliminazione di questi composti (sostanze organiche volatili e cloro libero) è causa di interferenza positiva poiché assorbono alla stessa lunghezza d'onda dei vapori del mercurio (253.7 nm).

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice.

Determinazione strumentale

La strumentazione necessaria per la determinazione strumentale consiste in un forno a microonde capace di generare una potenza di almeno 600 W e possibilmente in grado di monitorare sia la pressione che la temperatura all'interno dei recipienti utilizzati per la mineralizzazione e in uno spettrofotometro di assorbimento atomico che consenta il montaggio del sistema “*batch*” e del sistema “*flow injection*”, corredato di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici e possibilmente di sistema di intrappolamento dei vapori.

Completano le apparecchiature una lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame e il dispositivo che fornisce argon ultrapuro.

Reagenti e standard

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere a elevato grado di purezza:

- Acido nitrico concentrato (d = 1.40) di grado ultrapuro;
- Acido cloridrico concentrato (d = 1.19) di grado ultrapuro;
- Soluzione di NaBH₄ al 3% in NaOH all'1% per sistema “*batch*”;
- Soluzione di NaBH₄ (0.2 %) in NaOH (0.05%);
- Soluzione concentrata di mercurio (1 mg/ml).

Procedimento

Si procede inizialmente a una procedura di mineralizzazione, basata sull'esposizione controllata alle microonde di campioni in presenza di acido nitrico. Trasferire le soluzioni (campioni e bianchi) acidificate con HNO₃ (concentrazione finale di acido 1M, compresa l'aggiunta effettuata all'atto del prelievo) in contenitori di teflon PFA chiusi ermeticamente e procedere alla mineralizzazione per almeno 10 minuti erogando una potenza variabile tra 250 e 600 W.

Il volume di campione da sottoporre a mineralizzazione, la durata della stessa e la potenza erogata dovranno tuttavia essere ottimizzati in funzione della strumentazione disponibile e della particolare matrice analizzata.

Si costruisce la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione standard concentrata, e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.

Si esegue l'analisi dei campioni provenienti dal trattamento di mineralizzazione effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%.

Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità.

Nel caso di un numero notevole di campioni si controlla la taratura inserendo ogni 10 campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura, verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il $\pm 5\%$ del valore atteso.

Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

La curva di taratura di tipo lineare deve soddisfare i requisiti del D.lgs. 219/2010 (2009/90/CE e 2008/105/CE) e deve essere adeguata a ricercare concentrazioni inferiori o pari al 30% dello SQA dell'analita in esame. Deve contenere un minimo di 4 punti escluso lo zero e contenere i risultati di 3 bianchi. Una volta costruita si deve verificare quotidianamente, e prima di ogni corsa analitica, la correttezza della curva attraverso un bianco di taratura e più punti della curva.

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni ($\mu\text{g/l}$) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

Si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, a intervalli regolari di tempo, su materiale di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo).

3.2 Determinazione dei metalli nei sedimenti marini

Sulla base dei dati raccolti dal Gruppo di Lavoro 4 del SNPA, come riportato nel volume “Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine - Verifica delle metodologie ufficiali esistenti e la loro applicabilità alle matrici marine”, è stato possibile avere un quadro completo delle metodologie impiegate dalle varie Agenzie e dei relativi limiti di quantificazione.

Non emergono criticità particolari nella determinazione dei metalli nei sedimenti marini; solo per il cadmio alcune Agenzie mostrano limiti di quantificazione superiori a quelli previsti per l’ottemperanza al D.lgs. 172/2015. In Tabella 20 vengono riportati gli SQA e i LOQ richiesti per ciascun analita.

Tabella 20. SQA e LOQ richiesti per la determinazione dei metalli nei sedimenti marini.

Sostanza	SQA* (mg/kg s.s.)	LOQ* (mg/kg s.s.)
cadmio	0.3	0.1
mercurio	0.3	0.1
piombo	30	9
nichel*	30	9

*Valore SQA ai sensi del D.M. 260/2010

** Limite di quantificazione ai sensi del D.lgs. 219/2010 (2009/90/CE e 2008/105/CE)

Di seguito vengono riportati gli SQA per alcune specie metalliche diverse da quelle dell’elenco di priorità, previste dal D.M. 260/2010 e D.lgs. 172/2015 (Tabella 21). Per il cromo VI resta infatti l’obbligo del controllo nei sedimenti in considerazione del fatto che non è stato individuato lo standard di qualità nella colonna d’acqua (p.to A.2.7.1 all. 1 D.lgs. 172/2015).

Tabella 21. SQA e LOQ richiesti per la determinazione di altri metalli nei sedimenti marini.

Sostanza	SQA* (mg/kg s.s.)	LOQ* (mg/kg s.s.)
arsenico	12	3.6
cromo VI	2	0.6
cromo totale	50	15

*Valore SQA ai sensi del D.M. 260/2010

** Limite di quantificazione ai sensi del D.lgs. 219/2010 (2009/90/CE e 2008/105/CE)

3.2.1 Ricognizione metodologie ufficiali esistenti

Si riporta una panoramica dei metodi ufficiali esistenti sia a livello nazionale che internazionale (Tabella 22, Tabella 23). Non esistono metodi ISO specificamente dedicati all’analisi delle sostanze prioritarie nei sedimenti marini, mentre esistono diversi metodi EPA sviluppati per la determinazione di metalli e elementi in tracce in sedimenti marini e di acque dolci.

Una linea guida completa sull’analisi dei sedimenti marini, comprendente il pre-trattamento, lo stoccaggio, e la normalizzazione dei dati, è riportata nella linee guida OSPAR nel 2003 dal titolo “JAMP Guidelines for monitoring contaminants in sediment” e nella N. 25 “Guidance on chemical monitoring of sediment and biota under the water framework directive”.

Nella linea guida OSPAR e nella Guidance N. 25 il campione viene setacciato a < 2 mm e la parte passante omogeneizzata per l’analisi chimica; è possibile setacciare ulteriormente il sedimento in frazioni più fini e analizzare le singole frazioni ottenute.

Le metodiche ufficiali esistenti per la determinazione analitica dei metalli nei sedimenti marini prevedono generalmente una fase di preparativa o pre-trattamento che consiste nella digestione totale (con acido fluoridrico) o pseudo - totale del sedimento (con miscela di soluzioni di acido forte) (Smedes *et al.*, 2000; *intercalibrations QUASH/QUASIMEME*).

A questa segue la determinazione analitica che differisce, a seconda dell'analita.

Tabella 22. Metodologie ufficiali nazionali e internazionali per la determinazione dei metalli.

Metodo preparativa	Matrici	Procedura analitica
EPA 3050B:1996	sedimenti, rifiuti, suolo, oli	Digestione dei campioni con opportune soluzioni acide mediante sistema chiuso a microonde
EPA 3051A: 2007	sedimenti, rifiuti, suolo, oli	Digestione dei campioni con opportune soluzioni acide mediante sistema chiuso a microonde
EPA 200.2	acque, sedimenti, rifiuti, suolo, oli	Digestione dei campioni con acqua regia
UN EN ISO 13346 : 2002	fanghi	Digestione in acqua regia in forno a microonde
UN EN ISO 11466 : 1995	acque, suolo o materiale simile	Digestione dei campioni con acido nitrico
EPA 3060 : 1996	sedimenti, rifiuti, suolo e	Digestione alcalina per Cr(VI)
ISO 15587-1 : 2013	acque	Digestione dei campioni con acqua regia
ISO 15587-2 : 2013	acque	Digestione dei campioni con acqua regia
ICRAM 2001, Metodologie analitiche di riferimento	sedimenti	Digestione dei campioni con opportune soluzioni acide in sistema chiuso al microonde
IRSA-CNR-APAT Met.3010	acque	Digestione dei campioni con opportune soluzioni acide

Tabella 23. Metodologie ufficiali nazionali e internazionali per la determinazione dei metalli.

Determinazione strumentale	LOQ	Matrici	Strumentazione
ICRAM, 2001. Metodologie analitiche di riferimento	0.05 mg/kg s.s.	sedimento	CV-AAS
UN EN ISO 11885:2000 (rev.2009)	0.2- 5 µg/l	acqua	ICP-OES
EN ISO 17294-2:2004 (rev.2016)	0.002 -1 µg/l	acqua, sedimenti mineralizzati e rifiuti mineralizzati	ICP-MS
UN EN ISO 17852 (rev.2008)	10 ng/l	acque	AFS (Hg)
UN EN ISO 12846 (rev.2013)	0.01-0.05 µg/l	acque	AAS (Hg)
UN EN ISO 15586:2003	0.4-10 µg/l	acque e campioni mineralizzati	GT-AAS
EPA 6020b:2014	<0.1- 1 µg/l	acqua, sedimenti mineralizzati	ICP-MS
UN EN ISO 5961:1997	0.3 µg/l	acque	AAS (Cd)
EPA 6010c:2014	ordine mg/l	acque e campioni mineralizzati	ICP-OES
EPA 7131A:1994	0.5 µg/l	acque e campioni mineralizzati	AAS (Cd)
EPA 7421:1994	5 µg/l	acque e campioni mineralizzati	GT-AAS (Pb)
EPA 7060: 1994	5 µg/l	acque e campioni mineralizzati	GT-AAS (As)
EPA 7000B: 1992	mg/l	acque e campioni mineralizzati	F-AAS
EPA 7474: 2007	1 µg/l	sedimenti e campioni di biota	AFS (Hg)
EPA 7473:2007	0.05 µg/l	acque e solidi	DMA AAS (Hg)
EPA 7199: 1996	0.9-1.2 µg/l	acque e campioni mineralizzati	cromatografia ionica
EPA 7196A: 1992	0.5 mg/l	acque e campioni mineralizzati	colorimetria (Cr VI)
APHA methods	0.005 µg/l	acqua, sedimenti e campioni	ICP-MS
IRSA-CNR-APAT	0.1 µg/l	tutti tipi di acque	CV-AAS

3.2.2 Ricognizione delle prestazioni delle metodiche impiegate dalle Agenzie

Sulla base dei dati raccolti dal Gruppo di Lavoro 4 del SNPA, come riportato nel volume “*Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine - Verifica delle metodologie ufficiali esistenti e la loro applicabilità alle matrici marine*”, è stato possibile avere un quadro completo delle metodologie impiegate dalle varie Agenzie nell’analisi dei metalli in sedimenti marini e dei relativi limiti di quantificazione.

Le diverse metodiche adoperate per Cd, Pb, Ni, As e Cr, prevedono l’essiccazione del campione (a T = 30-35°C) cui segue una setacciatura (< 2 mm). Sulla frazione setacciata si conduce una digestione pseudo totale del sedimento seguendo la metodica EPA 3051 o la UN ISO 11466, che prevede una mineralizzazione con miscela di acidi forti, a caldo in un sistema chiuso a microonde.

Dopo questa fase, segue la determinazione strumentale del contenuto dei metalli, condotta con diverse metodologie a seconda della strumentazione disponibile nelle varie Agenzie: spettrofotometria a assorbimento atomico con fornello di grafite (GF-AAS), oppure con spettrometria di emissione atomica mediante plasma induttivamente accoppiato (ICP-OES) o spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS), seguendo ancora metodiche EPA e/o UN ISO.

La determinazione della sola frazione di cromo presente come Cr(VI), normato ai fini del monitoraggio d’indagine nei sedimenti, viene effettuata da 10 Agenzie. I metodi di estrazione del Cr (VI) prevedono una digestione alcalina, descritta nel metodo EPA (3060 estrazione) o una digestione rapida in acido solforico, riportata nel metodo IRSA (CNR IRSA Q64 1985). La determinazione strumentale è eseguita con cromatografia ionica o ICP-MS. Una sola Agenzia usa la polarografia pulsata per tale determinazione, mentre due Agenzie non eseguono tale determinazione.

Per il mercurio diverse Agenzie prevedono la mineralizzazione attraverso il metodo EPA 3051 o con la UN ISO 11466 seguita dalla determinazione strumentale con ICP-MS o CV-AAS; altre Agenzie utilizzano la determinazione tramite Analizzatore Diretto di Mercurio (DMA-80) senza pretrattamento del campione.

In generale, per la maggior parte dei parametri le Agenzie riescono a raggiungere un LOQ conforme, Solo per il cadmio alcune Agenzie non raggiungono un LOQ idoneo, nonostante le metodologie applicate siano tutte idonee a tale determinazione.

Sulla base delle metodologie standardizzate esistenti e delle metodologie impiegate e fornite dalle Agenzie, si riportano nei paragrafi successivi i dettagli dei procedimenti analitici applicabili per la determinazione dei metalli nei sedimenti marini.

3.2.3 Metodologia per il pretrattamento del campione

Per quanto riguarda la digestione acida per solubilizzare i metalli presenti nel campione di sedimento marino si riporta come esempio la digestione dei sedimenti con miscela di soluzione di acidi forti. L’utilizzo del forno a microonde permette di minimizzare i tempi di analisi e la quantità di acido da utilizzare.

Principio del metodo

Il metodo consiste in una digestione acida con una miscela di acidi forti a caldo in recipienti chiusi di campioni di sedimento per portare in soluzione i metalli adsorbiti chimicamente e/o presenti in forma colloidale e/o organica. I metalli così ottenuti possono essere analizzati con diverse tecniche strumentali. Nel rispetto delle principali norme di sicurezza, viene di preferenza evitato l’impiego di acido fluoridrico. In questo modo si può ottenere una solubilizzazione pseudo - totale che permette comunque di raggiungere un buon recupero rispetto alla effettiva concentrazione totale presente nel campione.

Apparecchiature e reagenti

La strumentazione utilizzata per la digestione acida è un mineralizzatore a microonde dotato di contenitori in grado di lavorare a alta pressione e i reagenti sono: acido nitrico (65%), acido cloridrico (37%) e acqua ultrapura.

Campionamento e conservazione del campione

Il campione viene prelevato con differenti campionatori a seconda della quantità necessaria e della profondità del sedimento da campionare. I contenitori adatti per il trasporto dei campioni sono in polietilene o polipropilene decontaminati, in quanto in altri tipi di plastica possono verificarsi fenomeni di adsorbimento e desorbimento.

Per il tempo intercorrente tra il prelievo e l'analisi, è opportuno conservare il campione a una temperatura inferiore a 4°C, se le analisi verranno eseguite in settimana, mentre è bene congelare i campioni se le analisi verranno eseguite in seguito.

Interferenze e cause di errore

Solventi, reagenti, vetreria, possono produrre interferenze nel campione di analisi, per cui devono essere decontaminati. Si consiglia di utilizzare il minor volume di soluzione acida possibile al fine di limitare la contaminazione dei campioni da parte delle impurezze contenute negli acidi e di preparare sempre dei bianchi di controllo.

Tale verifica deve essere effettuata al primo impiego dei suddetti materiali e durante tutto il periodo del loro utilizzo, inserendo l'analisi di bianchi di procedimento a ogni sequenza di estrazione. E' della massima importanza selezionare solventi di elevata purezza e verificare che non apportino, in particolare dopo la loro concentrazione, interferenze significative nella determinazione.

Procedimento

Trasferire un'opportuna quantità di campione, precedentemente essiccato in stufa e omogeneizzato, nei vessel del mineralizzatore con una miscela di acidi forti, di norma acqua regia ($\text{HNO}_3:\text{HCl} = 1:3$) e avviati nel ciclo di mineralizzazione. Dopo raffreddamento, l'estratto viene filtrato e portato a volume noto con acqua ultrapura. In ogni serie si deve prevedere un bianco e un campione di una matrice certificata per controllare l'intero processo.

Per il tempo intercorrente fino al momento della lettura analitica è opportuno conservare il campione a una temperatura inferiore a 4°C.

3.2.4 Determinazione di As, Cd, Cr tot, Pb, Ni e Hg nella soluzione mineralizzata

Il contenuto di As, Cd, Cr tot, Pb, Ni e Hg nella soluzione può essere determinato, a seconda del LOQ necessario a soddisfare i requisiti del D.lgs. 172/2015 con diverse tecniche strumentali: spettrofotometria a assorbimento atomico (GF-AAS) o spettrometria a emissione atomica mediante plasma induttivamente accoppiato (ICP-OES) a seconda sia del contenuto dell'analita nel campione in esame sia delle interferenze della matrice.

La tecnica di spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS), altamente sensibile, permette la determinazione simultanea di tutti questi analiti. Il contenuto di Hg può essere determinato con la tecnica dello strippaggio a vapori freddi previa riduzione del metallo con una soluzione di cloruro di stagno, o anche mediante DMA-80 che non necessita del pretrattamento del campione. Sono state superate, ormai ovunque, le tecniche che utilizzavano l'atomizzazione a fiamma.

3.2.5 Determinazione di As, Cd, Cr, Ni e Pb con GF-AAS

La determinazione di elementi in tracce mediante la spettrometria di assorbimento atomico, con atomizzazione elettrotermica in fornello di grafite è una tecnica strumentale semplice, rapida e sensibile. Permette di quantificare basse concentrazioni con l'utilizzo di una piccola quantità di volume di soluzione (20 µl). Il limite di rivelazione e quantificazione per ogni elemento dipende dalla matrice, dallo strumento, dal tipo di atomizzazione e dall'uso e dal tipo di modificante.

Principio del metodo

Lo spettrometro di assorbimento atomico è basato sulla capacità di ioni liberi di assorbire luce a una caratteristica lunghezza d'onda. Una sorgente di luce (lampada a catodo cavo) emette una radiazione elettromagnetica con uno spettro molto ristretto e caratteristico dell'elemento di cui è fatto il catodo stesso. Una piccola aliquota del campione di sedimento precedentemente mineralizzato, è iniettata nel fornello di grafite dello spettrometro di assorbimento atomico, scaldato elettricamente. Attraverso diverse fasi con temperatura crescente il campione, e quindi i metalli da ricercare, viene ridotto allo stato di gas monoatomico.

Le fasi sono: essiccazione del campione, combustione delle sostanze organiche (eventualmente presenti e che potrebbero compromettere una corretta analisi) e atomizzazione.

Allo stato monoatomico viene misurata la differenza di intensità tra la radiazione elettromagnetica, prima e dopo il passaggio a atomo.

Dalla misura del segnale di assorbanza specifico per ogni elemento, si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note dell'analita in esame.

Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione di numerosi elementi chimici presenti nella soluzione mineralizzata, con intervalli di concentrazioni specifici a seconda dell'analita, della matrice e dello strumento utilizzato. Il limite di quantificazione è compreso tra 0.4 µg/l e 10 µg/l a seconda dell'elemento e della matrice.

Interferenze e cause di errore

Le soluzioni dei campioni possono contenere una grande varietà di sostanze che possono interferire con l'analisi. Alte concentrazioni di cloruri possono causare sottostima delle concentrazioni, perché aumentano la volatilità di alcuni elementi e di conseguenza l'analita può andare perso durante lo step dell'incenerimento.

Gli effetti matrice possono essere contrastati mediante ottimizzazione del programma di temperature, uso di un modificante di matrice specifico per l'elemento in esame o aggiunte standard. E' consigliato l'uso della correzione di fondo.

Determinazione strumentale

Lo strumento è uno spettrometro GF-AAS, eventualmente corredato di auto campionatore che necessita di un flusso di gas argon di elevata purezza (99.99%).

Attrezzature per le analisi

- Provette e matracci in polietilene o polipropilene. Questo materiale non mostra significative alterazioni della matrice.
- Pipette a volume variabile di varia capacità dedicate.

Reagenti e standard

L'acqua deve essere ultrapura e priva di interferenze, mentre tutti gli acidi utilizzati sia per la preparazione del campione che per i lavaggi dello strumento, devono essere di purezza elevata, acido nitrico concentrato ($d = 1.40$).

Per soluzioni standard certificate si considerano solo soluzioni mare standard di elevata purezza ($\geq 99.99\%$) che di norma sono stabili 1 anno in accordo con le raccomandazioni della ditta produttrice.

Le soluzioni di calibrazioni devono essere preparate per diluizione dalle soluzioni standard concentrate di ogni analita in esame in modo da coprire l'intervallo di calibrazione.

Per quanto riguarda il modificante di matrice, a seconda del tipo di analita se ne utilizzano diversi, i più comuni sono Pd (NO₃)₂/Mg (NO₃)₂, di norma si utilizzano per il cadmio; il NH₄H₂PO₄ che si utilizza per il Piombo. Il Ni (NO₃)₂ è spesso usato come modificatore di matrice nella determinazione dell'arsenico.

Il bianco di taratura è necessario per la costruzione della curva di taratura (consiste in una soluzione di acqua ultra pura con la stessa combinazione e concentrazione degli acidi impiegati per preparare le soluzioni di taratura).

Procedimento

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, è indispensabile procedere alla ottimizzazione dei parametri strumentali specifici di ogni strumento; impostare lo strumento con parametri operativi idonei all'analisi prevista; ottimizzare gli *step* del programma di temperature; selezionare le lunghezze d'onda per la determinazione analitica (possono essere usate anche delle lunghezze d'onda alternative rispetto a quelle raccomandate se serve per aumentare la sensibilità e diminuire le interferenze).

Di norma si consiglia di lavorare in *peak area* per integrare l'assorbanza.

Calibrare lo strumento secondo le procedure raccomandate dal manuale di utilizzo dello strumento. Seguire la metodica riportata nel manuale al fine della costruzione della curva di taratura. Prima di eseguire l'analisi del campione impostare tutti i parametri strumentali seguendo quanto riportato nel manuale operativo dello strumento. Si consiglia di leggere i campioni alternando a essi delle soluzioni di taratura (ad esempio cinque campioni seguiti dalle soluzioni di taratura).

L'analisi dei campioni deve essere eseguita nell'intervallo coperto dalla retta di taratura e sia i campioni che le soluzioni di lavoro devono essere analizzati nelle stesse condizioni strumentali e effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare. Se il valore riscontrato nella misura di un campione risulta superiore a quello corrispondente alla soluzione di taratura con la maggiore concentrazione, ripetere l'analisi dopo opportuna diluizione del campione stesso. Alcuni problemi analitici sono associabili alla deposizione e/o alla ritenzione per adsorbimento dell'analita sulle superfici costitutive del sistema di introduzione del campione. Lavaggi ragionevolmente protratti fra un campione e l'altro, possono minimizzare o risolvere il problema solo nel caso di ritenzione reversibile o labile. Nel caso di analisi di componenti presenti a basse concentrazioni si raccomandano, pertanto, tempi medi di lavaggio dell'ordine di qualche decina di secondi e quando possibile, l'introduzione dei campioni in ordine crescente di concentrazione.

3.2.6 Determinazione di As, Cr, Cd, Ni e Pb con ICP-OES

L'uso della spettrometria di emissione atomica mediante plasma induttivamente accoppiato (ICP-OES) permette di effettuare l'analisi quantitativa di moltissimi elementi, simultaneamente, in un intervallo di linearità che può estendersi fino a cinque ordini di grandezza. La spettrometria al plasma presenta però alcuni svantaggi, tra cui le interferenze di tipo spettrale o da luce diffusa e diversi tipi di interferenze di fondo, oltre a costi relativamente elevati.

Si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. È responsabilità del laboratorio assicurare che il metodo analitico adottato, derivante dall'eventuale combinazione delle tecniche di preconcentrazione e determinazione strumentale menzionate, sia adatto allo scopo e in particolare, sia in grado di soddisfare i requisiti di prestazione analitica riguardo al limite di quantificazione e all'incertezza di misura. Nella verifica iniziale del metodo, il laboratorio deve effettuare una valutazione sperimentale almeno dei recuperi e della precisione a concentrazioni diverse, in particolare a quelle corrispondenti al LOQ e allo SQA.

La precisione deve essere verificata inizialmente mediante analisi della ripetibilità sul bianco e sugli standard usati per la taratura. La precisione deve essere valutata mediante delle prove di recupero sugli standard a diversa concentrazione.

A ogni sequenza analitica strumentale o almeno ogni dieci campioni dovrebbero essere effettuati un bianco di procedimento, una prova di recupero e, se possibile, una replica di un campione.

Gli standard di verifica della taratura dovrebbero dare uno scostamento massimo inferiore al 20% della concentrazione nominale; i bianchi, strumentali e di procedimento, dovrebbero dare risultati inferiori ai limiti di quantificazione relativi a ciascun analita.

Le prestazioni del laboratorio possono essere verificate, inoltre, attraverso analisi effettuate, a intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati tramite apposite carte di controllo. Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio e incertezza a esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

Principio del metodo

Il principio del metodo è la misura dell'intensità dell'emissione delle radiazioni elettromagnetiche emesse dagli atomi/ioni eccitati delle specie presenti nel campione, mediante tecniche spettrometriche con sorgente al plasma. Lo spettro caratteristico di emissione è prodotto da una radiofrequenza induttivamente accoppiata al plasma. Il campione e le soluzioni di taratura vengono opportunamente nebulizzate e l'aerosol viene trasportato nel plasma, dove, in seguito a fenomeni di eccitazione, avviene la produzione dello spettro di emissione composto dalle righe caratteristiche degli elementi presenti.

Tali righe, dopo essere state separate mediante un sistema di dispersione vengono inviate su un rivelatore (fotomoltiplicatore o a stato solido) che produce un segnale elettrico di intensità proporzionale all'intensità delle righe di emissione. Le intensità di emissione vengono rilevate, simultaneamente o in sequenza, e la concentrazione di analita presente nel campione viene determinata per confronto con una soluzione di riferimento a concentrazione nota.

Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione di numerosi elementi chimici presenti nella soluzione mineralizzata. Per ogni elemento si sceglie una lunghezza d'onda raccomandata. Si possono utilizzare altre lunghezze d'onda, se queste garantiscono una sensibilità sufficiente al soddisfacimento delle richieste analitiche e soprattutto la possibilità di minimizzare le eventuali interferenze spettrali presenti. Il campo di applicazione, i limiti di rivelabilità e i limiti di quantificazione ottenibili per ciascun elemento dipendono strettamente dalle caratteristiche tecniche dell'apparecchiatura utilizzata.

È bene notare che le numerose interferenze presenti durante la determinazione analitica con ICP-OES, creano una perdita in sensibilità del metodo per alcuni analiti. In particolare, per eseguire la determinazione di cadmio in un sedimento marino con la tecnica ICP-OES si devono necessariamente prevedere alcuni accorgimenti sul software per eliminare le interferenze, in particolare l'interferenza del ferro.

Con tali accortezze tuttavia si perde notevolmente in sensibilità, non riuscendo a raggiungere accuratamente un LOQ che soddisfi i requisiti della normativa nazionale. Per tale motivo si consigliano metodi alternativi per la determinazione del cadmio.

Interferenze e cause di errore

Qualsiasi caratteristica del campione che provoca una variazione dell'ampiezza del segnale di emissione rispetto ai campioni di riferimento, genera un disturbo. L'insieme di tutti i potenziali disturbi che conducono a errori di misura viene definito "interferenza". In considerazione poi dell'origine del disturbo, si definiscono interferenze chimiche, fisiche, spettrali (del fondo o di riga).

L'insieme delle interferenze menzionate (che possono essere potenzialmente presenti), se non adeguatamente corrette, producono variazioni dell'intercetta sull'asse Y della retta di taratura (effetto di tipo additivo) oppure variazione del coefficiente angolare della retta (effetto di tipo moltiplicativo).

L'effetto di tipo additivo è riconducibile a interferenze dovute al fondo o di riga mentre l'effetto di tipo moltiplicativo è riconducibile a interferenze di natura chimica e/o fisica che alterano i processi di trasporto alla torcia o di eccitazione, producendo modificazioni nel processo di nebulizzazione o di eccitazione.

Determinazione strumentale

Lo strumento è uno spettrometro ICP-OES, eventualmente corredato di auto campionatore che necessita di un flusso di gas argon di elevata purezza (99.99%).

Attrezzature per le analisi

- Provette e matracci in polietilene o polipropilene. Questo materiale non mostra significative alterazioni della matrice.
- Pipette a volume variabile di varia capacità dedicate.

Reagenti e standard

L'acqua deve essere ultrapura, priva di interferenze, e tutti gli acidi utilizzati sia per la preparazione del campione che per i lavaggi dello strumento, devono essere di purezza elevata. Per soluzioni standard certificate si considerano solo soluzioni madre standard di elevata purezza ($\geq 99.99\%$) che di norma sono stabili 1 anno in accordo con le raccomandazioni della ditta produttrice.

Le soluzioni di calibrazioni devono essere preparate per diluizione dalle soluzioni standard concentrate di ogni analita in esame in modo da coprire l'intervallo di calibrazione.

A seconda del tipo di strumento esistono soluzioni specifiche atte all'ottimizzazione delle condizioni strumentali (allineamento lunghezza d'onda, stabilizzazione del segnale, ecc.).

Infine è necessario un bianco di taratura per la costruzione della curva di taratura (consiste in una soluzione di acqua ultra pura con la stessa combinazione e concentrazione degli acidi impiegati per preparare le soluzioni di taratura).

Procedimento

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, è indispensabile procedere alla ottimizzazione dei parametri strumentali specifici di ogni strumento.

Lo strumento deve essere termicamente stabile prima di iniziare le analisi (di solito richiede almeno 30 minuti di riscaldamento prima della taratura). Per le condizioni di esercizio, l'analista dovrebbe seguire le istruzioni fornite dal costruttore dello strumento.

Calibrare lo strumento secondo le procedure raccomandate dal manuale di utilizzo dello strumento. Seguire la metodica riportata nel manuale al fine della costruzione della curva di taratura. Prima di eseguire l'analisi del campione impostare tutti i parametri strumentali seguendo quanto riportato nel manuale operativo dello strumento. Si consiglia di leggere i campioni alternando a essi delle soluzioni di taratura (ad esempio cinque campioni seguiti dalle soluzioni di taratura).

L'analisi dei campioni deve essere eseguita nell'intervallo coperto dalla retta di taratura; sia i campioni che le soluzioni di lavoro devono essere analizzati nelle stesse condizioni strumentali e effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare. Se il valore riscontrato nella misura di un campione risulta superiore a quello corrispondente alla soluzione di taratura con la maggiore concentrazione, ripetere l'analisi dopo opportuna diluizione del campione stesso.

Alcuni problemi analitici sono associabili alla deposizione e/o alla ritenzione per adsorbimento dell'analita sulle superfici costitutive del sistema di introduzione del campione. Lavaggi ragionevolmente protratti fra un campione e l'altro possono minimizzare o risolvere il problema solo nel caso di ritenzione reversibile o labile. Nel caso di analisi di componenti presenti a basse concentrazioni si raccomandano, pertanto, tempi medi di lavaggio dell'ordine di qualche decina di secondi e quando possibile, l'introduzione dei campioni in ordine crescente di concentrazione.

Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

Effettuare la taratura dello strumento secondo le procedure raccomandate dal manuale di utilizzo dello strumento. La maggior parte delle apparecchiature disponibili in commercio risultano completamente

assistite da mezzi informatici molto sofisticati, pertanto, è possibile condurre le operazioni analitiche (taratura e analisi) in completa automazione, secondo programmi di elaborazione molto versatili. Si costruisce una retta con un bianco di taratura e un minimo di 3-5 soluzioni calibranti per un appropriato range di concentrazione.

I dati analitici vengono espressi in mg/kg s.s mediante confronto con le curve di taratura, tenendo conto delle eventuali diluizioni effettuate. Non riportare valori di concentrazione inferiori ai limiti di quantificazione del metodo.

Si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. È responsabilità del laboratorio assicurare che il metodo analitico che si sceglie di adottare, derivante dall'eventuale combinazione delle tecniche di preconcentrazione e determinazione strumentale menzionate, sia adatto allo scopo e in particolare che sia in grado di soddisfare i requisiti di prestazione analitica riguardo al limite di quantificazione e all'incertezza. Nella verifica iniziale del metodo il laboratorio deve effettuare una valutazione sperimentale almeno dei recuperi e della precisione a concentrazioni diverse, in particolare a quelle corrispondenti al LOQ e allo SQA.

La precisione deve essere verificata inizialmente mediante analisi della ripetibilità sul bianco e sugli standard usati per la taratura. La precisione deve essere valutata mediante delle prove di recupero sugli standard a diversa concentrazione.

A ogni sequenza analitica strumentale o almeno ogni dieci campioni dovrebbero essere effettuati un bianco di procedimento, una prova di recupero e, se possibile, una replica di un campione.

Gli standard di verifica della taratura dovrebbero dare uno scostamento massimo inferiore al 20% della concentrazione nominale; i bianchi, strumentali e di procedimento, dovrebbero dare risultati inferiori ai limiti di quantificazione relativi a ciascun analita.

Le prestazioni del laboratorio possono essere verificate inoltre attraverso analisi effettuate, a intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati tramite apposite carte di controllo. Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio e incertezza a esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

3.2.7 Determinazione di As, Cd, Cr, Hg, Ni e Pb con ICP-MS

La spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) è applicabile alla determinazione di sub- $\mu\text{g/l}$ concentrazioni di As, Cd, Cr, Hg, Ni e Pb (come di un gran numero di altri elementi) in soluzioni mineralizzate.

Principio del metodo

La tecnica ICP-MS sfrutta la capacità del plasma, mantenuto a altissime temperature attraverso un generatore di radiofrequenze, di produrre ioni. Gli ioni prodotti nel plasma vengono ordinati in base ai loro rapporti massa/carica mediante un quadrupolo e quantificati con un moltiplicatore di elettroni. Il campione liquido viene convertito in aerosol, attraverso un nebulizzatore, e analizzato.

Le possibilità che vengono offerte con questa metodica sono:

- grande sensibilità e ampio intervallo dinamico di lavoro (concentrazioni dai ng/l ai mg/l);
- contemporanea determinazione di analiti;
- elevato grado di automazione;
- possibilità di determinare la distribuzione isotopica degli elementi.

Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione degli analiti in esame nell'intervallo di concentrazione utile al fine del rispetto dei requisiti del D.Lgs. 172/2015. Per concentrazioni superiori si può ricorrere alla diluizione

della soluzione di campione mineralizzata. Il più basso limite di quantificazione e il range lineare varia con la matrice, la strumentazione e le condizioni operative.

Interferenze e cause di errore

Solventi, reagenti e contenitori per la preparazione possono addurre interferenze alla procedura di analisi. Tutti i materiali devono essere testati al fine di dimostrare di essere privi di interferenti sotto le condizioni di analisi, attraverso l'analisi di bianchi.

Alcuni strumenti riescono attraverso accorgimenti del software (tipo diluizione *on line*) a diminuire le interferenze legate alla complessità della matrice o all'acidità della soluzione.

Il controllo di qualità può essere soggetto a errori sistematici per alcuni elementi (come il mercurio) che vengono addizionati di volta in volta al multistandard di controllo qualità in quanto poco stabili nel tempo.

Determinazione strumentale

Lo spettrometro ICP-MS con sistema di dati che permette correzioni di interferenze isobariche e l'applicazione della tecnica standard interno. Si raccomanda un regolatore flusso di massa per nebulizzare l'argon e una pompa peristaltica per la soluzione campione. Viste le interferenze poliatomiche normalmente presenti nella matrice in questione si consiglia l'impiego di He, eliminando la necessità di equazioni, poco affidabili, di correzione di interferenze. Il flusso di gas argon deve essere di elevata purezza (99.99%).

Attrezzature per le analisi

- Provette e matracci in polietilene o polipropilene. Questo materiale non mostra significative alterazioni della matrice.
- Pipette a volume variabile di varia capacità dedicate.

Reagenti e standard

Gli acidi devono essere di purezza elevata sia quelli usati per la preparazione del campione che per i lavaggi dello strumento, questa accortezza è fondamentale in considerazione dell'elevata sensibilità dello strumento. Non si possono leggere soluzioni con acidità superiore al 2% (v/v) per minimizzare i danni all'interfaccia e per ridurre al minimo le interferenze isobariche molecolari degli ioni di litio con gli analiti. Anche l'acqua utilizzata deve essere ultrapura, priva di interferenze.

Per quanto riguarda le soluzioni Standard certificate, si considerano solo soluzioni madre standard di elevata purezza ($\geq 99.99\%$).

Le soluzioni di calibrazione devono essere preparate per diluizione dalle soluzioni standard concentrate di ogni analita in esame a diverse concentrazioni per coprire l'intervallo lineare dello strumento, considerando sempre un'acidità di circa 1% di HNO₃. Di norma, le soluzioni utilizzate per la costruzione della retta di taratura sono ottenute attraverso la diluizione delle soluzioni standard da 100 µg/l, approssimativamente all'1% di HNO₃. È raccomandato l'uso di uno standard interno di opportuna concentrazione.

La soluzione di standard interni, a seconda dello strumento, può essere aggiunta in linea al momento dell'analisi utilizzando un secondo canale della pompa peristaltica e un collettore di miscelazione appropriato. È necessario un appropriato standard interno per ogni analita ricercato. Gli standard interni devono essere elementi contenuti a livelli trascurabili nel campione di prova e devono avere proprietà chimico-fisiche (es. massa ed energia di ionizzazione) il più possibile simili a quelle dell'elemento da determinare. Gli standard interni raccomandati sono quelli con massa atomica simile all'analita ricercato, di norma si utilizza una soluzione dei seguenti: ⁶Li, ⁴⁵Sc, ⁸⁹Y, ¹⁰³Rh, ¹¹⁵In, ¹⁵⁹Tb, ¹⁶⁵Ho e ²⁰⁹Bi. Di norma si consiglia una concentrazione dello standard interno a concentrazione sufficientemente alta da ottenere una buona precisione sul segnale.

Relativamente ai bianchi, ne sono necessari due tipi: il bianco di taratura che è usato nella costruzione della curva di taratura (consiste in una soluzione di acqua ultra pura con la stessa combinazione e concentrazione

degli acidi impiegati per preparare le soluzioni di taratura) e il bianco di lavaggio che è usato per evitare contaminazioni tra i campioni e gli standard (consistente in una soluzione al 2% di HNO₃). Per l'analisi del mercurio può essere opportuno che il bianco di lavaggio contenga anche HCl con concentrazione compresa tra 0.5-2% oppure 2 mg/ml di AuCl₃.

Sono ritenuti bianchi valori di concentrazioni dell'analita in esame non superiori a ½ LOQ.

Si deve porre attenzione a controllare le contaminazioni legate all'effetto memoria e/o ai fenomeni di contaminazione incrociata che si possono verificare se si analizzano sequenzialmente campioni e/o standard con grandi differenze di concentrazioni. Il periodo di lavaggio tra campioni deve essere sufficientemente lungo per eliminare tale fenomeno.

Infine, per la calibrazione dello strumento, si deve utilizzare una soluzione di tuning contenente le masse degli elementi di interesse per verificare che lo strumento funzioni correttamente in tutto il range di acquisizione. Questa soluzione è anche utilizzata per verificare che lo strumento abbia raggiunto la stabilità termica.

Procedimento

All'inizio di ogni sessione analitica si controlla la sensibilità e la stabilità del sistema usando soluzioni di ottimizzazione fornite dalla ditta costruttrice dello strumento. La curva di calibrazione viene eseguita a ogni utilizzo e deve coprire l'intero intervallo di concentrazioni da determinare; qualora le concentrazioni misurate risultassero superiori al punto più alto della taratura è necessario procedere alla diluizione dell'estratto e alla nuova analisi. Il punto più basso della taratura invece dovrebbe per lo meno corrispondere al LOQ richiesto per l'analita.

Per routine giornaliera, si tara lo strumento mediante un bianco, il livello di taratura più alto e ancora due o tre punti di taratura intermedi. Subito dopo la taratura si analizza un bianco reagenti per controllare gli eventuali effetti memoria e un campione di controllo qualità. Quindi si analizzano i campioni.

Ogni 10-20 campioni è bene inserire nuovamente un campione di controllo qualità per verificare il mantenimento della taratura. Insieme alla lettura delle soluzioni standard e ai campioni si deve leggere la soluzione contenente uno o più standard interni che consentono di controllare la sensibilità dello strumento durante la fase analitica e correggere le fluttuazioni. Si possono utilizzare delle equazioni per correggere eventuali interferenze. Tutte le operazioni vengono gestite dal software certificato dello strumento.

Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

La curva di taratura di tipo lineare deve soddisfare i requisiti del D.lgs. 219/2010 (2009/90/CE e 2008/105/CE) e deve essere adeguata a ricercare concentrazioni inferiori o pari al 30% dello SQA dell'analita in esame. Una volta costruita si deve verificare quotidianamente e prima di ogni corsa analitica, la correttezza della curva attraverso un bianco di taratura e più punti della curva.

Il software dello strumento determina i numeri di conteggi e la concentrazione dei diversi elementi associata a ogni campione. Il software permette di eseguire la taratura, la correzione sul bianco, la correzione dei conteggi con le equazioni di correzione, la determinazione della concentrazione degli analiti nelle soluzioni, la segnalazione di anomalie rispetto ai criteri di controllo stabiliti. Ogni laboratorio deve mantenere un programma atto all'assicurazione della qualità.

È responsabilità del laboratorio assicurare che il metodo analitico adottato, derivante dall'eventuale combinazione delle tecniche di preconcentrazione e determinazione strumentale menzionate, sia adatto allo scopo e in particolare che sia in grado di soddisfare i requisiti di prestazione analitica riguardo al limite di quantificazione e all'incertezza. Nella verifica iniziale del metodo il laboratorio deve effettuare una valutazione sperimentale almeno dei recuperi e della precisione a concentrazioni diverse, in particolare a quelle corrispondenti al LOQ e allo SQA.

La precisione deve essere verificata inizialmente mediante analisi della ripetibilità sul bianco e sugli standard usati per la taratura. La precisione deve essere valutata mediante delle prove di recupero sugli standard a diversa concentrazione.

A ogni sequenza analitica strumentale o almeno ogni dieci campioni dovrebbero essere effettuati un bianco di procedimento, una prova di recupero e, se possibile, una replica di un campione.

Gli standard di verifica della taratura dovrebbero dare uno scostamento massimo inferiore al 20% della concentrazione nominale; i bianchi, strumentali e di procedimento, dovrebbero dare risultati inferiori ai limiti di quantificazione relativi a ciascun analita.

Ai fine della determinazione della precisione è auspicabile l'utilizzo di materiali di riferimento certificati con matrice simile alla matrice in esame. È bene notare che i materiali di riferimento disponibili per le acque marine sono in numero esiguo e presentano spesso concentrazioni addirittura inferiori ai LOQ richiesti, rendendo difficile il loro utilizzo.

I risultati analitici vengono espressi in mg/kg s.s. con il numero di cifre significate indicate dal metodo di determinazione impiegato.

Il laboratorio dovrebbe partecipare a esercizi di confronto interlaboratorio sulla matrice specifica per gli analiti specifici.

3.2.8 Determinazione di Cr (VI)

L'estrazione selettiva della specie di cromo VI da solidi può essere effettuata con una singola fase di lisciviazione o con un sistema di estrazione sequenziale. Gli agenti estraenti possono essere sali di elettroliti come CaCl_2 o MgCl_2 , buffer o acidi deboli, come acido acetico o acido ossalico, agenti chelanti, come EDTA e DTPA, acidi forti, come HCl, HNO_3 , HClO_4 o basi quali NaOH o Na_2CO_3 . Per la speciazione del cromo andrebbe evitato l'uso di forti agenti estraenti, uniti alle temperature alte e ai tempi lunghi, poiché la riduzione del Cr (VI) è favorita in mezzi acidi mentre in soluzioni alcaline è favorita l'ossidazione del Cr (III). Una tecnologia di estrazione promettente che limita la conversione della specie è l'estrazione fluida supercritica (SFE); questa estrazione, eseguita a basse temperature e in tempi più brevi, può risultare vantaggiosa per i composti del cromo termolabili e facilmente ossidabili.

Il metodo più utilizzato per l'analisi del Cr (VI) è la digestione in ambiente alcalino a caldo; in successivamente, dopo l'estrazione da matrici solide, si prevede, generalmente, l'impiego di difenilcarbazide (DPC) che reagisce formando composti con il Cr (VI).

Per il rilevamento, i metodi spettroscopici sono i più utilizzati e comprendono spettrometria UV-visibile, AAS e ICP-AES. Altri metodi prevedono invece l'utilizzo della cromatografia liquida da alta prestazione (HPLC) accoppiata con la cromatografia ionica (IC).

Metodologia con digestione alcalina a caldo

Si riporta la procedura di digestione di un campione di sedimento in ambiente alcalino a caldo. Per quantificare in modo completo il Cr (VI) in una matrice solida devono essere soddisfatti tre criteri:

- la soluzione di estrazione deve solubilizzare tutte le forme di Cr (VI)
- le condizioni dell'estrazione non devono indurre la riduzione da Cr (VI) contenuta nel campione a Cr (III)
- il metodo non deve provocare l'ossidazione di Cr (III) contenuta nel campione a Cr (VI).

Da qui si evince che il mancato rispetto di un pH specifico comporta un'errata digestione del campione. L'ultimo criterio può risultare critico nel caso di estrazione in ambiente alcalino. Alla luce degli elementi sopra descritti negli ultimi anni si è andato sempre più affermando l'approccio di estrazione alcalino, tenuto conto anche del fatto che, grazie all'aggiunta alla soluzione estraente di Mg^{2+} , vengono minimizzati i processi di ossidazione da Cr (III) a Cr (VI), permettendo in questo modo all'approccio alcalino di soddisfare tutte e tre le condizioni.

Principio del metodo

Questo metodo utilizza una digestione alcalina per solubilizzare il cromo esavalente legato al sedimento marino. L'aggiunta del Mg^{2+} e il controllo del pH permettono una solubilizzazione completa e ripetibile.

Al campione viene aggiunto una soluzione di $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaOH}$; il campione viene posto in riscaldamento al fine di solubilizzare il Cr (VI) e stabilizzare la soluzione per ridurre la riduzione del Cr (III). Il Cr (VI) viene determinato eseguendo le misure di assorbanza alla lunghezza d'onda di 540 nm, dopo specifica aggiunta di difenilcarbazide (DPC) alla soluzione.

La reazione del cromo con DPC è molto sensibile e selettiva, è il metodo più comune e affidabile per l'analisi di Cr (VI) solubilizzato nella digestione alcalina.

Apparecchiature

Per la digestione alcalina a caldo è necessario un mineralizzatore a microonde dotato di contenitori in grado di lavorare a alta pressione. Sono necessari, inoltre, una bilancia analitica e un pHmetro.

Reagenti e standard

- Acido nitrico 5M con reagente di purezza elevata (RPE)
- Na_2CO_3 di purezza elevata (RPE) per la soluzione di digestione
- NaOH di purezza elevata (RPE) per la soluzione di digestione
- MgCl_2 di purezza elevata (RPE)
- Buffer fosfato pH = 7, costituito da: K_2HPO_4 di purezza elevata (RPE) e KH_2PO_4 di purezza elevata (RPE)
- PbCrO_4 di purezza elevata (RPE)
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ di purezza elevata (RPE)
- Acqua ultrapura.

Campionamento e conservazione del campione

Il campione viene prelevato con differenti campionatori a seconda della quantità necessaria, della profondità del sedimento da campionare.

I contenitori adatti sono in polietilene o polipropilene non contaminati, in quanto su altri tipi di plastica la concentrazione degli elementi, eventualmente disciolti nel campione, può variare a causa di fenomeni di adsorbimento e desorbimento degli stessi.

Per il tempo intercorrente tra il prelievo e l'analisi, è opportuno conservare il campione a una temperatura inferiore a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Si raccomanda di eseguire l'analisi il più presto possibile dal momento del prelievo per prevenire eventuali reazioni di ossido-riduzione. Il Cr (VI), tuttavia, ha dimostrato di essere stabile nel sedimento campionato umido per 30 giorni dalla raccolta del campione, e nella soluzione di digestione alcalina per 1 settimana a una temperatura inferiore a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Procedimento

La metodica di estrazione impiegata consiste in una digestione a caldo di un'aliquota del campione di sedimento (2.5 g) a temperatura controllata, compresa tra 90 e 95°C , per 60 minuti mediante una soluzione estraente basica (0.28 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/0.5$ M NaOH).

L'estratto del campione viene successivamente raffreddato, filtrato su filtri di carta e portato a un pH compreso tra 7.5 ± 0.5 con Acido Nitrico 5 M.

L'aggiunta di Mg^{2+} e di un tampone fosfato alla soluzione alcalina, evitano la sovrastima del Cr (VI) presente nei campioni dovuta all'ossidazione del cromo trivalente a cromo esavalente che può verificarsi durante la digestione alcalina.

3.2.9 Determinazione spettrofotometrica del Cr (VI)

Il metodo si basa sullo sviluppo del colore conseguente alla reazione tra Cr (VI) e DPC. Con tale reazione si ha la riduzione da Cr (VI) a Cr (III) e la contemporanea ossidazione della difenilcarbazide a difenilcarbazono con conseguente formazione di un composto colorato in rosso-violetto. Il Cr (VI) viene determinato eseguendo misure di assorbanza alla lunghezza d'onda di 540nm.

Campo di applicazione

Questo metodo consente la determinazione del Cr (VI) dal campione digerito nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0.5 e 50 mg/l. Concentrazioni più elevate possono essere determinate previa diluizione del campione.

Il limite di quantificazione ottenuto da un singolo laboratorio può differire a seconda della natura del campione e della strumentazione utilizzata.

Interferenze e cause di errore

La reazione su cui si basa il metodo è assai specifica tanto che alla lunghezza d'onda di 540 nm le interferenze sono praticamente trascurabili con una banda passante dello strumento sufficientemente stretta. Altri metalli quali il Hg, Mo e V potrebbero dare interferenze positive in quanto formano con il DPC complessi colorati; tuttavia la debole interferenza delle colorazioni di tali complessi e il rapporto in concentrazione a favore del Cr, rendono trascurabili tali interferenze.

Causa di interferenze negative può essere costituita da sostanze ossidanti come NO₂, e cloro libero in concentrazioni elevate che provocano decomposizioni del complesso colorato.

Procedimento

Si preparano gli standard di taratura di Cr (VI) a ogni inizio analisi per diluizione della soluzione concentrata di riferimento.

Successivamente si aggiunge H₂SO₄ (1:1) e si porta a volume con acqua deionizzata.

La determinazione colorimetrica del Cr (VI) viene effettuata mediante l'aggiunta di 2 ml di difenilcarbazide (DPC) in acetone. Dopo un tempo di attesa di circa 15 minuti vengono effettuate le letture allo spettrofotometro a 540 nm utilizzando celle con cammino ottico di 10 mm.

Lo strumento viene preliminarmente azzerato mediante la misura di un bianco preparato con acqua deionizzata e H₂SO₄. La retta di taratura viene costruita mediante la lettura dell'assorbanza delle soluzioni di taratura a concentrazione nominale nota.

Conservazione del campione digerito

Si raccomanda di eseguire l'analisi il più presto possibile poiché la stabilità di Cr (VI) nelle soluzioni digerite non è completamente conosciuta. Per limitare e ritardare l'attività chimica del cromo esavalente, gli estratti devono essere conservati a 4°C fino al momento dell'analisi. Il tempo massimo di detenzione prima dell'analisi è di 24 ore dopo l'estrazione.

Apparecchiature e attrezzature per le analisi

Per la determinazione strumentale è necessario uno spettrofotometro per misure nel campo del visibile munito di celle con cammino da 1 cm o superiori.

Vetreteria da laboratorio decontaminata con HNO₃ e acqua ultrapura.

Reagenti e standard

– Soluzione concentrata di Standard di Cr (VI) a elevato grado di purezza

-
- Soluzioni diluite di Cr (VI)
 - Acido solforico concentrato a elevato grado di purezza
 - Acido nitrico concentrato a elevato grado di purezza
 - Soluzione di Difencilcarbazide (1.5-Difencilcarbazide) in acetone, conservata in bottiglia scura e rinnovare soluzione quando si rileva una decolorazione.

Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

Si preparano gli standard per la curva di taratura di Cr (VI) a ogni inizio analisi per diluizione della soluzione concentrata di riferimento. La curva di taratura deve prevedere un bianco e almeno tre standard di concentrazione. Ogni laboratorio deve mantenere un programma atto all'assicurazione della qualità.

È responsabilità del laboratorio assicurare che il metodo analitico che si sceglie di adottare, derivante dall'eventuale combinazione delle tecniche di preconcentrazione e determinazione strumentale menzionate, sia adatto allo scopo e, in particolare, che sia in grado di soddisfare i requisiti di prestazione analitica riguardo al limite di quantificazione e all'incertezza. Nella verifica iniziale del metodo il laboratorio deve effettuare una valutazione sperimentale almeno dei recuperi e della precisione a concentrazioni diverse, in particolare a quelle corrispondenti al LOQ e allo SQA.

La precisione deve essere verificata inizialmente mediante analisi della ripetibilità sul bianco e sugli standard usati per la taratura. La precisione deve essere valutata mediante delle prove di recupero sugli standard a diversa concentrazione. A ogni sequenza analitica strumentale o almeno ogni dieci campioni dovrebbero essere effettuati un bianco di procedimento, una prova di recupero e, se possibile, una replica di un campione.

Gli standard di verifica della taratura dovrebbero dare uno scostamento massimo inferiore al 20% della concentrazione nominale, i bianchi, strumentali e di procedimento, dovrebbero dare risultati inferiori ai limiti di quantificazione relativi a ciascun analita.

Per ogni matrice del campione analizzato si deve verificare che non sussistano condizioni che possano creare interferenza chimica da compromettere lo sviluppo del colore. Questo può essere realizzato analizzando una seconda aliquota con aggiunta di Cr (VI) a un pH controllato tra 9 e 9.5 con lo stesso volume di soluzione tampone usata per il campione.

Ai fine della determinazione della precisione è auspicabile l'utilizzo di materiali di riferimento certificati con matrice simile alla matrice in esame. I risultati devono essere espressi in mg/kg s.s.. Il laboratorio dovrebbe partecipare a esercizi di confronto interlaboratorio sulla matrice specifica per gli analiti specifici.

3.2.10 Determinazione del Cr (VI) con cromatografia ionica

Il metodo permette la determinazione del cromo esavalente attraverso la Cromatografia Ionica (IC).

Campo di applicazione

Questo metodo consente la determinazione del Cr (VI) dal campione digerito nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0.3 e 0.4 µg/l. Concentrazioni più elevate possono essere determinate previa diluizione del campione.

Interferenze e cause di errore

Le interferenze sono legate a diverse fonti che possono inficiare la determinazione accurata del Cr (VI). Tracce di cromo esavalente possono riscontrarsi nei sali, anche se di elevato grado di purezza, usati per la composizione della soluzione tampone. Si possono verificare riduzioni di Cr (VI) a Cr (III) se il pH risulta mediamente acido.

Inoltre, campioni contenenti elevati livelli di specie anioniche come solfato e cloruro possono causare un sovraccarico della colonna. I campioni contenenti livelli elevati di sostanze organiche o solfuri causano una rapida riduzione del Cr (VI) a Cr (III).

Procedimento

Si preparano gli standard di taratura di Cr (VI) a ogni inizio analisi per diluizione della soluzione concentrata di riferimento. I campioni devono avere un pH tamponato in equilibrio alla temperatura ambiente.

Si stabilizza lo strumento con le condizioni operative riportate nel manuale della casa produttrice dello strumento.

Un'aliquota di estratto (approssimativamente 3 ml) a un pH tra 9 e 9.5 viene introdotto nel cromatografo ionico. Una pre-colonna rimuove le sostanze organiche. Successivamente una colonna a scambio anionico separa il Cr (VI) dal CrO_4^{2-} .

A seguire, una colonna di miscelazione permette la reazione tra Cr (VI) e difenilcarbazide, a cui segue il rilevamento del complesso colorato a una lunghezza d'onda pari a 540 nm.

Conservazione del campione digerito

Si raccomanda di eseguire l'analisi il più presto possibile poiché la stabilità di Cr (VI) nelle soluzioni digerite non è completamente conosciuta. Per limitare e ritardare l'attività chimica del cromo esavalente, gli estratti devono essere conservati a 4°C fino al momento dell'analisi.

Il tempo massimo di detenzione prima dell'analisi è di 24 ore dopo l'estrazione.

Apparecchiature e attrezzature per le analisi

- Cromatografo ionico
- Vetreria da laboratorio decontaminata con acido nitrico, acido cloridrico e acqua
- Necessità di flusso di gas elio di elevata purezza (99.99%)
- Pre-colonna per rimuovere le sostanze organiche fortemente assorbenti e particelle che potrebbero danneggiare la colonna di separazione
- Colonna analitica - Una colonna riempita con una resina a scambio anionico in grado di separare CrO_4^{2-} da altri costituenti del campione
- Post-colonna, o reattore a membrana, con bobina per la miscelazione
- Rilevatore a luce visibile (lunghezza d'onda 530 nm) con cella di flusso che non contiene parti metalliche in contatto con il percorso di flusso eluente
- Registratore, integratore, o un computer per la ricezione di segnali analogici o digitali per la registrazione della risposta del rivelatore (altezza di picco o area) in funzione del tempo
- pHmetro.

Reagenti e standard

Tutti i reagenti devono essere di elevato grado di purezza. Altri gradi di purezza possono essere usati se si dimostra che hanno una purezza sufficiente da permettere l'analisi senza compromettere l'accuratezza della determinazione.

- Soluzione concentrata di Standard di Cr (VI) a elevato grado di purezza (1000 mg/l)
- Soluzioni diluite di Cr (VI)
- Acido solforico concentrato a elevato grado di purezza
- Soluzione eluente:
 - Idrossido di ammonio NH_4OH
 - Solfato di ammonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

-
- 1.5-Difenilcarbazide
 - Metanolo con grado di purezza per analisi in HPLC
 - Acqua ultrapura.

Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

Si preparano gli standard per la curva di taratura del Cr (VI) a ogni inizio analisi per diluizione della soluzione concentrata di riferimento. La curva di taratura deve prevedere un bianco e almeno tre standard di concentrazione. Si seguono le istruzioni della guida dello strumento al fine di seguire la costruzione della retta di taratura.

Si costruisce una curva di taratura con le risposte (altezza del picco o area) dell'analita rispetto alla concentrazione dell'analita. Il coefficiente di correlazione della curva deve essere pari almeno a 0.99. Ogni laboratorio deve mantenere un programma atto all'assicurazione della qualità.

È responsabilità del laboratorio assicurare che il metodo analitico adottato, derivante dall'eventuale combinazione delle tecniche di preconcentrazione e determinazione strumentale menzionate, sia adatto allo scopo e in particolare sia in grado di soddisfare i requisiti di prestazione analitica riguardo al limite di quantificazione e all'incertezza. Nella verifica iniziale del metodo il laboratorio deve effettuare una valutazione sperimentale almeno dei recuperi e della precisione a concentrazioni diverse, in particolare a quelle corrispondenti al LOQ e allo SQA.

La precisione deve essere verificata inizialmente mediante analisi della ripetibilità sul bianco e sugli standard usati per la taratura. La precisione deve essere valutata mediante prove di recupero sugli standard a diversa concentrazione.

A ogni sequenza analitica strumentale o almeno ogni dieci campioni dovrebbero essere effettuati un bianco di procedimento, una prova di recupero e, se possibile, iniettare in doppio i campioni. La deviazione standard relativa al campione iniettato in doppio non deve superare il 20%.

Gli standard di verifica della taratura dovrebbero dare uno scostamento massimo inferiore al 10% della concentrazione nominale, i bianchi, strumentali e di procedimento, dovrebbero dare risultati inferiori ai limiti di quantificazione relativi a ciascun analita.

Al fine della determinazione della precisione è auspicabile l'utilizzo di materiali di riferimento certificati con matrice simile alla matrice in esame. I risultati devono essere espressi in mg/kg s.s.

Il laboratorio dovrebbe partecipare a esercizi di confronto interlaboratorio sulla matrice specifica per gli analiti specifici.

3.2.11 Determinazione strumentale di Hg

Il contenuto di Hg può essere determinato sul campione precedentemente mineralizzato, oltre che con ICP-MS, con la tecnica dello strippaggio a vapori freddi previa riduzione del metallo con una soluzione di cloruro di stagno o con spettrometria a fluorescenza atomica.

Inoltre si può utilizzare un analizzatore diretto di mercurio (DMA-80) che non necessita del pretrattamento del campione.

3.2.12 Determinazione di Hg con CV-AAS

La spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) rappresenta ancora la tecnica più conveniente e diffusa per la determinazione del mercurio.

Il Hg (II) ottenuto dal trattamento preliminare di ossidazione del campione viene ridotto a mercurio elementare, vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa e quindi trasferito mediante un gas inerte nella cella di misura.

Principio del metodo

Il mercurio viene determinato mediante spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) alla lunghezza d'onda di 253.7 nm utilizzando due possibili configurazioni strumentali: sistema "batch" oppure "flow injection".

Il metodo si avvale di una ossidazione chimica in forno a microonde in cui avviene la decomposizione della sostanza organica e dei composti organomercurici (eventualmente presenti) e la trasformazione di tutto il mercurio presente a Hg (II).

Successivamente il Hg (II), ridotto dal sodio boridruro a Hg elementare, viene vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa e quindi trasferito mediante un gas inerte nella cella di misura.

Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del mercurio totale in soluzioni di campioni mineralizzati nell'intervallo di concentrazione da 0.5 a 50 µg/l. Per concentrazioni superiori a 50 µg/l è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.

Interferenze e cause di errore

Sostanze organiche volatili, eventualmente presenti, possono essere eliminate nella fase di "stripping" che precede la riduzione. In tale fase viene eliminato anche l'eventuale cloro che può essere presente. La incompleta eliminazione di questi composti (sostanze organiche volatili e cloro libero) è causa di interferenza positiva poiché assorbono alla stessa lunghezza d'onda dei vapori del mercurio (253.7 nm).

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice.

Solventi, reagenti e contenitori per la preparazione possono addurre interferenze alla procedura di analisi. Tutti i materiali devono essere testati al fine di dimostrare di essere privi di interferenti sotto le condizioni di analisi, attraverso l'analisi di bianchi.

Determinazione strumentale

Un forno a microonde capace di generare una potenza di almeno 600 W e possibilmente in grado di monitorare sia la pressione che la temperatura all'interno dei recipienti utilizzati per la mineralizzazione. Per la determinazione uno spettrofotometro di assorbimento atomico che consenta il montaggio del sistema "batch" e del sistema "flow injection", corredato di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici e possibilmente di sistema di intrappolamento dei vapori.

Completano la strumentazione una lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame e un dispositivo che fornisce argon ultrapuro.

Reagenti e standard

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere a elevato grado di purezza.

- Acido nitrico concentrato (d = 1.40) di grado ultrapuro
- Acido cloridrico concentrato (d = 1.19) di grado ultrapuro
- Soluzione di NaBH₄ al 3% in NaOH all'1% per sistema "batch"
- Soluzione di NaBH₄ (0,2 %) in NaOH (0.05%)
- Soluzione concentrata di mercurio (1 mg/ml)

Procedimento

Si procede inizialmente a una procedura di mineralizzazione, basata sull'esposizione controllata alle microonde di campioni in presenza di acido nitrico. Trasferire le soluzioni (campioni e bianchi) acidificate con HNO_3 (concentrazione finale di acido 1M, compresa l'aggiunta effettuata all'atto del prelievo) in contenitori di teflon PFA chiusi ermeticamente e procedere alla mineralizzazione per almeno 10 minuti erogando una potenza variabile tra 250 e 600 W. Il volume di campione da sottoporre a mineralizzazione, la durata della stessa e la potenza erogata dovranno tuttavia essere ottimizzati in funzione della strumentazione disponibile e della particolare matrice analizzata.

Costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione standard concentrata, e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.

Quindi eseguire l'analisi dei campioni provenienti dal trattamento di mineralizzazione effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%.

Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità.

Nel caso di un numero notevole di campioni si controlla la taratura inserendo ogni 10 campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura, verificando che il valore di quest'ultima risulti entro $\pm 5\%$ del valore atteso.

Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

La taratura deve contenere un minimo di tre punti, escluso lo zero, e contenere i risultati di tre bianchi. La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni ($\mu\text{g/l}$) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

Si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, a intervalli regolari di tempo, su materiale di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo).

3.2.13 Determinazione di Hg con CV-AFS

La spettrometria di fluorescenza atomica con i vapori freddi è una tecnica molto sensibile per la determinazione del mercurio. Con questa tecnica viene misurata la fluorescenza emessa dal campione, la cui intensità è direttamente proporzionale all'intensità della sorgente.

Principio del metodo

Il mercurio presente viene ossidato a mercurio divalente per aggiunta di BrCl . Si eliminano i cloruri in eccesso con una soluzione di cloruro di idrossilammina ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$). Tutto il mercurio divalente viene ridotto a mercurio elementare per addizione al campione di SnCl_2 .

Mediante tecnica *purge and trap* con azoto o argon, i vapori di mercurio elementare vengono preconcentrati (secondo il principio dell'amalgama con l'oro) su una trappola contenente quarzo ricoperto d'oro.

Successivamente, per desorbimento termico della trappola (campione), i vapori di mercurio vengono trasportati nella linea analitica da un flusso di Argon (*carrier gas*) e amalgamati nuovamente su una seconda trappola (analitica).

Si procede successivamente al desorbimento termico di quest'ultima e il mercurio trasportato dal carrier nella cella di misura viene rilevato mediante fluorescenza atomica CV-AFS.

L'azoto o l'argon utilizzato per il *purge and trap* del campione deve essere di elevato grado di purezza e eventuali tracce di mercurio presenti devono essere eliminate mediante una trappola d'oro inserita sulla linea del gas prima dell'ingresso nel gorgogliatore.

Campo di applicazione

Il metodo permette la determinazione del Hg nell'intervallo di concentrazione utile al fine del rispetto dei requisiti del D.lgs. 172/2015, di norma 0.5-100 ng/l. Per concentrazioni superiori a 100 ng/l è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.

Interferenze e cause di errore

Si devono evitare contaminazioni nel corso della determinazione analitica. Solventi, reagenti e contenitori per la preparazione possono addurre interferenze alla procedura di analisi. Tutti i materiali devono essere testati al fine di dimostrare di essere privi di interferenti sotto le condizioni di analisi, attraverso l'analisi di bianchi.

Determinazione strumentale

Lo spettrometro deve essere equipaggiato con un rivelatore a fluorescenza atomica munito di *mass flow controller* per il gas (CV-AFS), nel caso in cui il rivelatore non ne sia provvisto, deve essere utilizzato un Mass Flow Controller. Necessità di flusso di gas Argon 5.0 e di gas Azoto 5.0.

Reagenti e standard

Tutti i reattivi, l'acqua utilizzata per il lavaggio della vetreria e dei materiali utilizzati per la preparazione delle soluzioni devono essere a elevato grado di purezza: l'acqua deve essere ultrapura, priva di interferenze e l'acido cloridrico, se possibile ultra-puro per il mercurio (< 5 pg/L), altrimenti per analisi in tracce.

Per quanto riguarda gli altri reagenti, di seguito è riportata la loro preparazione.

Idrossilammina-cloridrato: 300 ng di $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ portati a 1 l di volume con acqua ultrapura. La soluzione viene purificata aggiungendo 1 ml di SnCl_2 e sottoposta a purging per 12 ore in corrente di N_2 Hg-free (interponendo nella linea una colonnina di quarzo riempita con oro). Si conserva in bottiglia di Teflon.

Cloruro stannoso: 200 g di $\text{SnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 100 ml di HCl concentrato portato a 1 l di volume finale con acqua ultrapura. La soluzione viene purificata per 12 ore in corrente di N_2 Hg-free (interponendo nella linea una colonnina di quarzo riempita con oro). Si conserva in bottiglia di Teflon ben chiusa.

Cloruro di bromo: lavorando con attenzione sotto cappa si sciolgono 27 g di KBr in 2.5 L di HCl concentrato. Si pone in agitazione per circa 1 ora. Successivamente si aggiungono con estrema cautela 38 g di KBrO_3 tenendo la soluzione risultante sempre sotto agitazione. Alla fine dell'aggiunta la soluzione dovrebbe virare da giallo a rosso arancio. Si chiude il contenitore debolmente e si lascia sotto agitazione per un'altra ora. Si conserva in bottiglia di Teflon ben chiusa.

Soluzione standard di mercurio: si considerano solo soluzioni madre standard (10000 mg/kg) in soluzione acquosa, di elevata purezza ($\geq 99,99\%$).

Le soluzioni di calibrazioni devono essere preparate per diluizione dalle soluzioni standard concentrate di ogni analita in esame a diverse concentrazioni per coprire l'intervallo lineare dello strumento.

Procedimento

Alla soluzione del campione mineralizzata si aggiungono una aliquota adeguata di $\text{HCl}_{12\text{N}}$ o di BrCl (500 μl ogni 100 ml). Dopo l'ossidazione (almeno 24 ore) il campione è addizionato con $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ allo scopo di eliminare l'eccesso di alogeni. Chiudere il contenitore a agitare sino a scomparsa del colore giallo.

Attendere il completamento della reazione per 5 minuti agitando periodicamente e assicurandosi che non sia rimasta più traccia di alogeni.

Connettere una trappola in oro al *bubbler* contenente il campione e aggiungere 0.5 ml di SnCl₂. Mettere il tutto in *purging* in corrente di N₂ a 350 ± 50 ml/min per 20 minuti. In tal modo si ottiene la conversione di Hg (II) alla forma volatile Hg (0). Hg (0) viene separato dalla soluzione mediante strippaggio in corrente di azoto e raccolto su trappola in oro. Segue il desorbimento termico dalla trappola in oro e il trasporto mediante corrente di argon in cella a fluorescenza (CV-AFS) per la determinazione finale.

La trappola in oro viene rimossa e posta nel sistema di desorbimento termico per circa 3 minuti in corrente di argon. Una volta completata la lettura viene lasciata raffreddare e è pronta per la successiva determinazione.

Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

La taratura deve contenere un minimo di quattro punti, escluso lo zero, e contenere i risultati di tre bianchi. Gli standard si analizzano per addizione di aliquote crescenti a partire dalla soluzione di mercurio standard direttamente dentro i *bubblers* di riduzione. Il software permette di eseguire la taratura e di determinare la concentrazione degli analiti nelle soluzioni.

Ogni laboratorio deve mantenere un programma atto all'assicurazione della qualità. Nella verifica iniziale del metodo il laboratorio deve effettuare una valutazione sperimentale almeno dei recuperi e della precisione a concentrazioni diverse, in particolare a quelle corrispondenti al LOQ e allo SQA.

La precisione deve essere verificata inizialmente mediante analisi della ripetibilità sui livelli bianco, e sugli standard usati per la taratura. La precisione deve essere valutata mediante delle prove di recupero sugli standard a diversi livelli.

3.2.14 Determinazione di Hg con DMA-80

Questa metodica permette la determinazione della concentrazione di mercurio presente nel campione in esame in tempi brevi, attraverso la decomposizione termica della matrice seguita dalla rivelazione con assorbimento atomico, senza necessità di pretrattamento (sia sul campione di sedimento umido che sedimento essiccato).

Questo strumento è altamente sensibile e completamente automatizzato, permette la fruizione da parte anche di tecnici non altamente specializzati.

Principio del metodo

In una fornace a riscaldamento controllato, il mercurio viene liberato grazie alla decomposizione della matrice, sia da campioni solidi che umidi che da soluzioni acquose e trasportato attraverso un flusso di ossigeno a un amalgama che lo trattiene. Tale amalgama per successivo riscaldamento rilascia il mercurio. Il rivelatore effettua quindi la misura del segnale.

Il processo inizia quando il campione, posto su una navicella, entra nella fornace e viene prima essiccato e poi termicamente e chimicamente decomposto. I prodotti di decomposizione sono trasportati dal flusso di ossigeno alla sezione catalitica del forno. L'ossidazione è completata e gli alogeni e gli ossidi di azoto/zolfo sono intrappolati.

I prodotti di decomposizione rimanenti vengono poi trasportati a una amalgama che intrappola selettivamente mercurio. Dopo il sistema viene lavato con ossigeno per rimuovere eventuali altri gas o prodotti di decomposizione. Quindi l'amalgama viene rapidamente riscaldata, rilasciando vapori di mercurio.

Il flusso di ossigeno porta i vapori di mercurio al rivelatore costituito da spettrofotometro a assorbimento atomico. La misura dell'assorbanza (altezza di picco o area del picco) è misurata a 253.7 nm in funzione della concentrazione di mercurio.

Campo di applicazione

Il campo di lavoro tipico per questo metodo è di 0.05-600 ng. Il limite di rivelabilità di questo metodo è 0.01 ng di Hg.

Campionamento e conservazione del campione

Le procedure di campionamento sono di pertinenza del committente per il quale il Laboratorio predispone apposite procedure per il corretto campionamento e i contenitori idonei.

Il campione umido deve essere conservato a +4°C e analizzato entro 1 settimana, mentre il campione essiccato deve essere conservato a temperatura ambiente per un massimo di 6 mesi.

Interferenze e cause di errore

Si devono evitare contaminazioni nel corso del processo di campionamento e di analisi. Solventi, reagenti e contenitori per la preparazione possono addurre interferenze alla procedura di analisi.

Tutti i materiali devono essere testati al fine di dimostrare di essere privi di interferenti sotto le condizioni di analisi, attraverso l'analisi di bianchi.

Effetti di memoria tra le analisi si possono riscontrare se si analizzano campioni con concentrazioni di mercurio superiori ai 400 ng. In genere, per ridurre al minimo gli effetti di memoria, si consiglia di analizzare i campioni suddivisi in lotti di bassa e alta concentrazione, analizzando sempre per primo quelli a bassa concentrazione. Se questo non è possibile, si consiglia dopo l'analisi di un campione, un'analisi in bianco per un tempo prolungato di decomposizione al fine di limitare effetti di memoria.

Determinazione strumentale

Lo strumento è un analizzatore automatico di mercurio (DMA-80) che necessita di un flusso di gas ossigeno a elevata purezza.

Reagenti e standard

Tutti i reattivi, l'acqua utilizzata per il lavaggio della vetreria e dei materiali utilizzati per la preparazione delle soluzioni devono essere a elevato grado di purezza: l'acqua deve essere ultrapura, priva di interferenze.

Per la soluzione standard di mercurio, si considerano solo soluzioni madre standard (1000 mg/kg) in soluzione acquosa, di elevata purezza ($\geq 99.99\%$).

Le soluzioni di calibrazioni devono essere preparate per diluizione dalle soluzioni standard concentrate di ogni analita in esame a diverse concentrazioni per coprire l'intervallo lineare dello strumento. La stabilità delle soluzioni variano tra 24-48 ore dalla preparazione.

Procedimento

I parametri analitici dipendono dalle dimensioni del campione (peso), dal tipo di matrice e dallo strumento specifico. Si consiglia di consultare il manuale d'uso per le raccomandazioni della ditta produttrice. Tempi supplementari o alternativi possono essere determinati attraverso prove durante l'ottimizzazione della metodica utilizzando materiali di riferimento standard appropriati per la matrice di interesse.

Inizialmente si costruisce la curva di taratura che può essere suddivisa in due curve (alte e basse concentrazioni) o essere un'unica curva a seconda dello strumento in dotazione.

Per l'analisi del campione, si pesa una quantità di campione omogeneizzato, in una navicella in nichel. Si annota il peso del campione e si introduce la navicella nello strumento. Il campione contenuto nella navicella viene sottoposto a cicli di riscaldamento. Il mercurio liberato viene dapprima trattenuto dall'amalgama d'oro e poi rilasciato e misurato nelle celle di misura.

Per ogni programma si sceglie la durata di essiccamento, di decomposizione e il tempo di concentramento su amalgama; si hanno dei valori prefissati in funzione della quantità di campione. La quantità massima di campione è dipendente dal tipo di navicella utilizzata.

Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

La curva di taratura viene costruita seguendo la procedura riportata dalla ditta produttrice dello strumento. Si può costruire utilizzando soluzioni a concentrazione nota o materiali di riferimento certificati. Si costruiscono due curve a bassa concentrazione (5-50 ng) e a alta concentrazione (50-500 ng), oppure un'unica curva per l'intero intervallo (5-500 ng), analizzando almeno in doppio le soluzioni a concentrazione nota di mercurio o la quantità fissa di materiali di riferimento certificati. La curva deve contenere un minimo di 5 punti escluso lo zero e contenere i risultati di 3 bianchi.

Il software permette di costruire la curva e di determinare la concentrazione degli analiti nelle soluzioni.

Ogni laboratorio deve mantenere un programma atto all'assicurazione della qualità. Nella verifica iniziale del metodo il laboratorio deve effettuare una valutazione sperimentale almeno dei recuperi e della precisione a concentrazioni diverse, in particolare a quelle corrispondenti al LOQ e allo SQA.

La precisione deve essere valutata mediante delle prove di recupero sulle concentrazioni standard a diversi livelli.

Di norma si ottengono valori di RSD inferiori al 10%, legati all'omogeneità dei campioni e dalla concentrazione di mercurio.

3.3 Determinazione metalli in organismi marini

Il D.lgs. 172/2015 (2013/39/EU) prevede nella matrice biota la ricerca del solo mercurio. Il valore di SQA è espresso come peso umido e non pone particolare problemi per il raggiungimento dei LOQ (Tabella 24). Nella raccolta delle metodologie analitiche utilizzate dalle Agenzie, alcune di esse non hanno presentato la metodica poiché non eseguono la determinazione di questo parametro. Nel decreto lo SQA per il biota è riferito ai pesci, ma si può monitorare un taxon alternativo o un'altra matrice purché lo SQA applicato garantisca un livello equivalente di protezione.

Tabella 24. SQA e LOQ richiesti per la determinazione del mercurio nel biota

Sostanza	SQA (µg/kg p.u.)	LOQ* (µg/kg p.u.)
mercurio	20	6

*Limite di quantificazione ai sensi del D.lgs. 219/2010 (2009/90/CE e 2008/105/CE)

3.3.1 Ricognizione metodologie ufficiali esistenti

I metodi ufficiali esistenti a livello nazionale e internazionale per la determinazione analitica del mercurio nel biota sono in parte coincidenti con quelli che trattano la determinazione dei metalli, nei sedimenti e nelle acque, e consentono di raggiungere limiti di quantificazione adeguati. Le metodiche ufficiali esistenti per la determinazione analitica del mercurio nel biota prevedono la determinazione diretta sull'aliquota di campione tal quale, oppure una fase di preparativa o pre-trattamento se la determinazione strumentale viene eseguita sull'analita portato in soluzione, come nel caso del CV-AAS e ICP-MS (Tabella 25, Tabella 26). La determinazione analitica quindi differisce nella strumentazione utilizzata.

Tabella 25. Metodologie ufficiali nazionali e internazionali per la determinazione del mercurio.

Metodo preparativa	Matrice	Procedura analitica
EPA 3052:1996	matrici silicee e organiche	Digestione dei campioni con opportune soluzioni acide mediante sistema chiuso a microonde
ISO 15587-1:2013	tutti tipi di acque	Digestione dei campioni con acqua regia
ISO 15587-2:2013	tutti tipi di acque	Digestione dei campioni con acido nitrico
IRSA-CNR-APAT Met. 3010	tutti tipi di acque	Mineralizzazione acida
ICRAM 2001, Metodologie analitiche di riferimento	biota	Digestione campioni con opportune soluzioni HNO ₃ e H ₂ O ₂ o con HCl e HNO ₃ (3:1) mediante sistema chiuso a microonde

Tabella 26. Metodologie ufficiali nazionali e internazionali per la determinazione del mercurio.

Determinazione strumentale	LOQ	Matrice	Strumentazione
IRSA-CNR-APAT	0.1 µg/l	tutti tipi di acque	CV-AAS
APHA methods 3125-2008 (rev. 2012)	0.005 µg/l	acqua, sedimenti e campioni biologici dopo opportune digestione	ICP-MS
EN ISO 17852:2008	0.001 µg/l	acqua	AFS
EN ISO 17294-2 (rev.2016)	0.1-1 µg /l	acqua, sedimenti (campioni mineralizzati) e rifiuti (campioni)	ICP-MS
EPA 6020b:2014 (rev.2017)	< 0.1-1 µg/l	acqua, sedimenti campioni mineralizzati	ICP-MS
EPA 1631e:2002: 2004	0.0005 µg/l	tutti tipi di acque	CV-AFS
EPA 245.7:	0.0005 µg/l	tutti tipi di acque	CV-AFS
EPA 7474:2007	1 µg/l	sedimento e biota	AFS
EPA 7473:2007	0.0005 µg/l	biota	DMA-80
ICRAM 2001, Metodologie analitiche di	0.05 mg/kg p.s.	biota	CV-AAS

3.3.2 Ricognizione delle prestazioni delle metodiche impiegate dalle Agenzie

Sulla base dei dati raccolti dal Gruppo di Lavoro 4 del SNPA, come riportato nel volume “*Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine - Verifica delle metodologie ufficiali esistenti e la loro applicabilità alle matrici marine*”, è stato possibile avere un quadro completo delle metodologie impiegate dalle varie Agenzie e dei relativi limiti di quantificazione.

In base ai dati aggiornati a maggio 2016, sono dieci Agenzie che eseguono la determinazione del mercurio nel biota e quasi tutte risultano conformi al LOQ richiesto. Le metodiche scelte riguardano essenzialmente una mineralizzazione con soluzione acida, seguita dalla determinazione strumentale con assorbimento atomico con vapori freddi (CV-AAS), o spettrometria di emissione con plasma induttivamente accoppiato e spettrometria di massa (ICP-MS), e anche determinazione del mercurio totale con analizzatore diretto (DMA-80).

Sulla base delle metodologie standardizzate esistenti e delle metodologie impiegate e fornite dalle Agenzie, si riportano nei paragrafi successivi i dettagli dei procedimenti analitici applicabili per la determinazione del mercurio nel biota.

L’analisi del mercurio ha sempre richiesto abilità e accuratezza operativa. Tra gli aspetti che rendono delicata l’analisi del mercurio vi è la risposta analitica di questo elemento che richiede procedure dedicate, anche in sistemi simultanei, e molto spesso impone l’utilizzo di kit specifici.

Per questo motivo spesso si preferisce adoperare una metodica specifica per la sua determinazione, invece di usufruire di una metodica multicomponente. Disporre di uno strumento dedicato può semplificare molto la routine analitica e l’analisi, in questo modo, risulta molto più rapida e meno problematica.

3.3.3 Metodologia per il pretrattamento del campione

Il campione viene ottenuto dalla dissezione dei tessuti degli organismi e viene analizzato dopo essiccazione. È necessario effettuare la determinazione del contenuto d’acqua. Per quanto riguarda la digestione acida l’utilizzo del forno a microonde permette di minimizzare i tempi di analisi e la quantità di acido da utilizzare.

3.3.4 Principio del metodo

Il metodo consiste in una digestione acida con una miscela di acidi forti a caldo in recipienti chiusi di campioni essiccati per portare in soluzione i metalli associati alla matrice organica. L’aggiunta di perossido di idrogeno (30%) in piccole quantità (1-2 ml) può aiutare la completa ossidazione della materia organica.

3.3.5 Campionamento e conservazione del campione

Relativamente ai pesci, immediatamente dopo la cattura gli esemplari devono essere suddivisi per specie, pesati e misurati per la valutazione dei parametri biometrici (taglia, dimensioni, sesso, ecc.) e successivamente suddivisi in sub-campioni per la determinazione del mercurio. La stima del bioaccumulo deve essere eseguita sul muscolo di ciascuna specie (composto o da un singolo esemplare o da un pool di esemplari a seconda delle dimensioni). La dissezione deve essere eseguita mediante utensileria e contenitori decontaminati e i sub campioni conservati in congelatore fino al momento delle analisi.

Per quanto riguarda i mitili, gli organismi vivi devono essere trasportati in laboratorio a temperature comprese tra 5°C e 10°C in contenitori chiusi per evitare contaminazioni.

La dissezione deve essere eseguita mediante utensileria e contenitori decontaminati, prelevando le parti molli di esemplari di taglia omogenea (70-90% della massima lunghezza della conchiglia) e conservandole in congelatore, annotando peso delle carni e lunghezza e peso delle conchiglie. Si utilizza l’intero tessuto dell’organismo. Si costituiscono pool di circa 30 individui di taglia media e per ogni pool si costituiscono tre repliche in modo da avere una buona rappresentatività del campione.

I contenitori adatti sono in polietilene o polipropilene non contaminati, in quanto su altri tipi di plastica la concentrazione degli elementi, eventualmente disciolti nel campione, varia piuttosto rapidamente a causa di fenomeni di adsorbimento e desorbimento degli stessi.

Per il tempo intercorrente tra il prelievo e l'analisi, è opportuno conservare il campione a una temperatura inferiore a 4°C. Se il campione non viene analizzato in tempi brevi, si deve conservare il campione a una temperatura inferiore a -18°C.

La concentrazione deve essere espressa in peso umido e è quindi necessario, nel caso si essicchi il campione, determinarne il contenuto d'acqua per poter poi convertire le concentrazioni da peso secco a peso umido.

Apparecchiature e reagenti

La strumentazione utilizzata per la digestione acida è un mineralizzatore a microonde dotato di contenitori in grado di lavorare a alta pressione e i reagenti sono: acido nitrico (65%), perossido di idrogeno (30%) e acqua ultrapura.

3.3.6 Interferenze e cause di errore

Solventi, reagenti, vetreria, possono produrre interferenze nel campione di analisi, per cui devono essere decontaminati. Si consiglia di utilizzare il minor volume di soluzione acida possibile al fine di limitare la contaminazione dei campioni da parte delle impurezze contenute negli acidi e di preparare sempre dei bianchi di controllo.

Tale verifica deve essere effettuata al primo impiego dei suddetti materiali e durante tutto il periodo del loro utilizzo, inserendo l'analisi di bianchi di procedimento a ogni sequenza di estrazione. È della massima importanza selezionare solventi di elevata purezza e verificare che non apportino, in particolare dopo la loro concentrazione, interferenze significative nella determinazione.

Bisogna porre attenzione nel limitare la perdita di analiti volatili per formazione di gas di reazione, a tal fine l'aggiunta dei reagenti deve essere lenta in modo da non favorire reazioni violente.

Procedimento

Il campione essiccato deve essere omogeneizzato e macinato. Si trasferiscono 0.1-0.5 g di campione, precedentemente essiccato in stufa e omogeneizzato, nei vessel del mineralizzatore con una miscela di HNO₃ (7 ml) e di H₂O₂ (1 ml) e si avviano nel ciclo di mineralizzazione.

Dopo raffreddamento, l'estratto viene trasferito nei palloni da 25 ml, portati a volume con acqua ultrapura. In ogni serie si deve prevedere un bianco, un campione di una matrice certificata per controllare l'intero processo e un campione eseguito in triplo.

Per il tempo intercorrente fino al momento della lettura analitica è opportuno conservare il campione a una temperatura inferiore a 4°C.

Il contenuto di Hg può essere determinato con la tecnica dello strippaggio a vapori freddi previa riduzione del metallo con una soluzione di cloruro di stagno, o con ICP-MS e anche con un DMA-80 che non necessita del pretrattamento del campione.

3.3.7 Determinazione di Hg con CV-AAS

La spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) rappresenta ancora la tecnica più conveniente e diffusa per la determinazione del mercurio. Il Hg (II) ottenuto dal trattamento preliminare di ossidazione del campione viene ridotto a Hg elementare, vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa e quindi trasferito mediante un gas inerte nella cella di misura.

Principio del metodo

Il mercurio viene determinato mediante spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) alla lunghezza d'onda di 253.7 nm utilizzando due possibili configurazioni strumentali: sistema "batch" oppure "flow injection". Il metodo si avvale di una ossidazione chimica in forno a microonde in cui avviene la decomposizione della sostanza organica e dei composti organomercurici (eventualmente presenti) e la trasformazione di tutto il mercurio presente a Hg (II). Successivamente il Hg (II), ridotto dal sodio boroidruro a mercurio elementare, viene vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa e quindi trasferito mediante un gas inerte nella cella di misura.

Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del mercurio totale in soluzioni di campioni mineralizzati nell'intervallo di concentrazione da 0.5 a 50 µg/l. Per concentrazioni superiori a 50 µg/l è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.

Interferenze e cause di errore

Sostanze organiche volatili, eventualmente presenti, possono essere eliminate nella fase di "stripping" che precede la riduzione. In tale fase viene eliminato anche l'eventuale cloro che può essere presente. La incompleta eliminazione di questi composti (sostanze organiche volatili e cloro libero) è causa di interferenza positiva poiché questi assorbono alla stessa lunghezza d'onda dei vapori del mercurio (253.7 nm). L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice.

Solventi, reagenti e contenitori per la preparazione possono addurre interferenze alla procedura di analisi. Tutti i materiali devono essere testati al fine di dimostrare di essere privi di interferenti sotto le condizioni di analisi, attraverso l'analisi di bianchi.

Determinazione strumentale

Lo strumento per la determinazione è lo spettrofotometro di assorbimento atomico che consente il montaggio del sistema "batch" e del sistema "flow injection", corredato di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici e possibilmente di sistema di intrappolamento dei vapori. Completano le apparecchiature necessarie una lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame e un dispositivo che fornisce argon ultrapuro.

Reagenti e standard

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere a elevato grado di purezza:

- Acido nitrico concentrato (d = 1.40) di grado ultrapuro;
- Acido cloridrico concentrato (d = 1.19) di grado ultrapuro;
- Soluzione di NaBH₄ al 3% in NaOH all'1% per sistema "batch";
- Soluzione di NaBH₄ (0.2 %) in NaOH (0.05%);
- Soluzione concentrata di mercurio (1 mg/ml).

Procedimento

Inizialmente si procede alla costruzione della curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione standard concentrata, e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.

Quindi eseguire l'analisi dei campioni provenienti dal trattamento di mineralizzazione effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%.

Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità.

Nel caso di un numero notevole di campioni si controlla la taratura inserendo ogni 10 campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura, verificando che il valore di quest'ultima risulti entro $\pm 5\%$ del valore atteso.

Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

La taratura deve contenere un minimo di quattro punti, escluso lo zero, e contenere i risultati di tre bianchi. La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni ($\mu\text{g/l}$) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

Si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, a intervalli regolari di tempo, su materiale di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo).

3.3.8 Determinazione di Hg con CV-AFS

La spettrometria di fluorescenza atomica con i vapori freddi è una tecnica molto sensibile per la determinazione del mercurio. Con questa tecnica viene misurata la fluorescenza emessa dal campione, la cui intensità è direttamente proporzionale all'intensità della sorgente.

Principio del metodo

Il mercurio presente nel campione viene ossidato a mercurio divalente per aggiunta di BrCl . Si eliminano i cloruri in eccesso con una soluzione di idrossilammina idrocloruro ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$). Tutto il mercurio divalente viene ridotto a mercurio elementare per addizione al campione di SnCl_2 .

Mediante la tecnica *purge and trap* con azoto o argon, i vapori di mercurio elementare vengono preconcentrati (secondo il principio dell'amalgama con l'oro) su una trappola contenente quarzo ricoperto di oro. Successivamente, per desorbimento termico della trappola (campione), i vapori di mercurio vengono trasportati nella linea analitica da un flusso di Argon (*carrier gas*) e amalgamati nuovamente su una seconda trappola (analitica). Si procede successivamente al desorbimento termico di quest'ultima e il mercurio trasportato dal *carrier* nella cella di misura viene rilevato mediante fluorescenza atomica CVAFS (*Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry*).

L'azoto o l'argon utilizzato per il *purge and trap* del campione deve essere di elevato grado di purezza e eventuali tracce di mercurio presenti devono essere eliminate mediante una trappola d'oro inserita sulla linea del gas prima dell'ingresso nel gorgogliatore.

Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del mercurio nelle soluzioni mineralizzate nell'intervallo di concentrazione utile al fine del rispetto dei requisiti del D.lgs. 172/2015 (20 $\mu\text{g/kg}$ p.u.). Per concentrazioni superiori si può ricorrere alla diluizione del campione. Il più basso limite di quantificazione e il range lineare varia con la matrice, la strumentazione e le condizioni operative.

Interferenze e cause di errore

Si devono evitare contaminazioni nel corso dell'analisi. Solventi, reagenti e contenitori per la preparazione possono addurre interferenze alla procedura di analisi. Tutti i materiali devono essere testati al fine di dimostrare di essere privi di interferenti sotto le condizioni di analisi, attraverso l'analisi di bianchi.

Determinazione strumentale

Lo spettrometro deve essere equipaggiato con un rivelatore a fluorescenza atomica munito di *mass flow controller* per il gas (CV-AFS), nel caso in cui il rivelatore non ne sia provvisto, deve essere utilizzato un Mass Flow Controller. Necessità di flusso di gas argon 5.0 e di gas azoto 5.0.

Reagenti e standard

Tutti i reattivi, l'acqua utilizzata per il lavaggio della vetreria e dei materiali utilizzati per la preparazione delle soluzioni devono essere a elevato grado di purezza: l'acqua deve essere ultrapura, priva di interferenze e l'Acido cloridrico, se possibile ultra-puro per il mercurio (< 5 pg/l), altrimenti per analisi in tracce. Per quanto riguarda gli altri reagenti, di seguito è riportata la loro preparazione.

Idrossilamina-cloridrato: 300 ng di $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ portati a 1 l di volume con acqua ultrapura. La soluzione viene purificata addizionando 1 ml di SnCl_2 e sottoposta a *purging* per 12 ore in corrente di N_2 *Hg-free* (interponendo nella linea una colonnina di quarzo riempita con oro). Si conserva in bottiglia di Teflon.

Cloruro stannoso: 200 g di $\text{SnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 100 ml di HCl concentrato portato a 1 l di volume finale con acqua ultrapura. La soluzione viene purificata per 12 ore in corrente di N_2 *Hg-free* (interponendo nella linea una colonnina di quarzo riempita con oro). Si conserva in bottiglia di Teflon ben chiusa.

Cloruro di bromo: lavorando con attenzione sotto cappa si sciolgono 27 g di KBr in 2.5 l di HCl concentrato. Si pone in agitazione per circa 1 ora. Successivamente si aggiungono con estrema cautela 38 g di KBrO_3 tenendo la soluzione risultante sempre sotto agitazione. Alla fine dell'aggiunta la soluzione dovrebbe virare da giallo a rosso arancio. Si chiude il contenitore debolmente e si lascia sotto agitazione per un'altra ora. Si conserva in bottiglia di Teflon ben chiusa.

Soluzione standard di mercurio: si considerano solo soluzioni madre standard (10000 mg/kg) in soluzione acquosa, di elevata purezza ($\geq 99.99\%$).

Le soluzioni di calibrazioni devono essere preparate per diluizione dalle soluzioni standard concentrate di ogni analita in esame a diverse concentrazioni per coprire l'intervallo lineare dello strumento.

Procedimento

Alla soluzione mineralizzata del campione si addizionano una aliquota adeguata di $\text{HCl}_{12\text{N}}$ o di BrCl (500 μl ogni 100 ml). Dopo l'ossidazione (almeno 24 ore) il campione è addizionato con $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ allo scopo di eliminare l'eccesso di alogeni. Chiudere il contenitore a agitare sino a scomparsa del colore giallo. Attendere il completamento della reazione per 5 minuti agitando periodicamente e assicurandosi che non sia rimasta più traccia di alogeni. Connettere una trappola in oro al *bubbler* contenente il campione e addizionare 0.5 ml di SnCl_2 . Mettere il tutto in *purging* in corrente di N_2 a 350 ± 50 ml/min per 20 minuti.

In tal modo si ottiene la conversione di Hg (II) alla forma volatile Hg (0). Hg (0) viene separato dalla soluzione mediante stripping in corrente di azoto e raccolto su trappola in oro. Segue il desorbimento termico dalla trappola in oro e il trasporto mediante corrente di argon in cella a fluorescenza (CVAFS) per la determinazione finale.

La trappola in oro viene rimossa e posta nel sistema di desorbimento termico per circa 3 minuti in corrente di Ar. Una volta completata la lettura viene lasciata raffreddare e è pronta per la successiva determinazione.

Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

La taratura deve contenere un minimo di cinque punti, escluso lo zero, e contenere i risultati di tre bianchi. Gli standard si analizzano per addizione di aliquote crescenti a partire dalla soluzione di mercurio standard

direttamente dentro i bubblers di riduzione. Il software permette di eseguire la taratura e di determinare la concentrazione degli analiti nelle soluzioni.

Ogni laboratorio deve mantenere un programma atto all'assicurazione della qualità. Nella verifica iniziale del metodo il laboratorio deve effettuare una valutazione sperimentale almeno dei recuperi e della precisione a concentrazioni diverse, in particolare a quelle corrispondenti al LOQ e allo SQA. La precisione deve essere valutata mediante prove di recupero sugli standard a diversi livelli.

3.3.9 Determinazione di Hg con ICP-MS

La spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) è applicabile alla determinazione di sub- $\mu\text{g/l}$ concentrazioni di un gran numero di elementi, tra cui il mercurio, in soluzioni mineralizzate. L'acidità della soluzione non deve superare il 2% (v/v).

Principio del metodo

La tecnica ICP-MS sfrutta la capacità del plasma, mantenuto a altissime temperature attraverso un generatore di radiofrequenze, di produrre ioni.

Gli ioni prodotti nel plasma vengono ordinati in base ai loro rapporti massa/carica mediante un quadrupolo e quantificati con un moltiplicatore di elettroni.

Il campione liquido viene convertito in aerosol, attraverso un nebulizzatore, e analizzato. Le possibilità che vengono offerte con questa metodica sono:

- grande sensibilità e ampio intervallo dinamico di lavoro (concentrazioni dai ng/l ai mg/l);
- contemporanea determinazione di analiti;
- elevato grado di automazione;
- possibilità di determinare la distribuzione isotopica degli elementi.

Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del mercurio nelle soluzioni mineralizzate nell'intervallo di concentrazione utile al fine del rispetto dei requisiti del D.lgs. 172/2015 (20 $\mu\text{g/kg}$ p.u.). Per concentrazioni superiori si può ricorrere alla diluizione del campione. Il limite di quantificazione e il range lineare varia con la matrice, la strumentazione e le condizioni operative.

Interferenze e cause di errore

Solventi, reagenti e contenitori per la preparazione possono addurre interferenze alla procedura di analisi. Tutti i materiali devono essere testati al fine di dimostrare di essere privi di interferenti sotto le condizioni di analisi, attraverso l'analisi di bianchi.

Alcuni strumenti riescono attraverso accorgimenti del software (tipo diluizione on line) a diminuire le interferenze legate alla complessità della matrice o all'acidità della soluzione. Inoltre, con tale accorgimento si riesce a soddisfare facilmente il LOQ definito dalla normativa..

Il controllo di qualità può essere soggetto a errori sistematici per alcuni elementi (come il mercurio) che vengono addizionati di volta in volta al multistandard di controllo qualità in quanto poco stabili nel tempo.

Determinazione strumentale

Lo spettrometro ICP-MS con sistema di dati permette correzioni di interferenze isobariche e l'applicazione della tecnica standard interno. Si utilizza un regolatore flusso di massa per nebulizzare l'argon e si raccomanda una pompa peristaltica per la soluzione campione.

Viste le interferenze poliatomiche presenti nella matrice si consiglia l'utilizzo di He eliminando la necessità di equazioni di correzione interferenze inaffidabili. Il flusso di gas argon deve essere di elevata purezza (99.99%).

Attrezzature per le analisi

- Provette e matracci in polietilene o polipropilene. Questo materiale non mostra significative alterazioni della matrice.
- Pipette a volume variabile di varia capacità dedicate.

Reagenti e standard

Gli acidi devono essere di purezza elevata sia quelli usati per la preparazione del campione che per i lavaggi dello strumento, questa accortezza è fondamentale in considerazione dell'elevata sensibilità dello strumento. Non si possono leggere soluzioni con acidità superiore al 2% (v/v) per minimizzare i danni all'interfaccia e ridurre al minimo le interferenze isobariche molecolari degli ioni di litio con gli analiti. Anche l'acqua utilizzata deve essere ultrapura, priva di interferenze. Per quanto riguarda le Soluzioni Standard certificate, si considerano solo soluzioni madre standard di elevata purezza ($\geq 99.99\%$).

Le soluzioni di calibrazione devono essere preparate per diluizione dalle soluzioni standard concentrate di ogni analita in esame a diverse concentrazioni per coprire l'intervallo lineare dello strumento, considerando sempre un'acidità di circa 1% di HNO₃ 0.5% HCl. Di norma, le soluzioni utilizzate per la costruzione della retta di taratura sono ottenute attraverso la diluizione delle soluzioni standard da 100 µg/l, approssimativamente all'1% di HCl.

È raccomandato l'uso di uno standard interno di opportuna concentrazione. La soluzione di standard interni, a seconda dello strumento, può essere aggiunta in linea al momento dell'analisi utilizzando un secondo canale della pompa peristaltica e un collettore di miscelazione appropriato. È necessario un appropriato standard interno per ogni analita ricercato. Gli standard interni raccomandati sono quelli con massa atomica simile all'analita ricercato, di norma si utilizza una soluzione dei seguenti standard interni: ⁶Li, ⁴⁵Sc, ⁸⁹Y, ¹⁰³Rh, ¹¹⁵In, ¹⁵⁹Tb, ¹⁶⁵Ho e ²⁰⁹Bi.

Relativamente ai Bianchi, ne sono necessari due tipi: il bianco di taratura che è usato nella costruzione della curva di taratura (consiste in una soluzione di acqua ultra pura con la stessa combinazione e concentrazione degli acidi impiegati per preparare le soluzioni di taratura) e il bianco di lavaggio che è usato per evitare contaminazioni tra i campioni e gli standard (consistente in una soluzione al 2% di HNO₃). Per l'analisi del mercurio è opportuno che il bianco di lavaggio contenga anche HCl con concentrazione compresa tra 0.5 e 2% oppure 2 mg/ml di AuCl₃. Sono ritenuti bianchi valori di concentrazioni dell'analita in esame non superiori a ½ LOQ.

Si deve porre attenzione a controllare le contaminazioni legate all'effetto memoria e/o ai fenomeni di contaminazione incrociata che si possono verificare se si analizzano sequenzialmente campioni e/o standard con grandi differenze di concentrazioni. Il periodo di lavaggio tra campioni deve essere sufficientemente lungo per eliminare tale fenomeni.

Infine, per la calibrazione dello strumento, si deve utilizzare una soluzione di tuning contenente le masse degli elementi di interesse per verificare che lo strumento funzioni correttamente in tutto il range di acquisizione. Questa soluzione è anche utilizzata per verificare che lo strumento abbia raggiunto la stabilità termica.

Procedimento

Una volta alla settimana si controlla la sensibilità e la stabilità del sistema usando soluzioni di ottimizzazione fornite dalla ditta costruttrice dello strumento. Per routine giornaliera, si tara lo strumento mediante un bianco, il livello di taratura più alto e ancora due o tre punti di taratura intermedi. Subito dopo la taratura si analizza un bianco reagenti per controllare gli eventuali effetti memoria e un campione di controllo qualità. Quindi si analizzano i campioni.

Ogni 10-20 campioni viene inserito nuovamente un campione di controllo qualità per verificare il mantenimento della taratura. Insieme alla lettura delle soluzioni standard e ai campioni si deve leggere la soluzione contenente uno o più standard interni che consentono di controllare la sensibilità dello strumento durante la fase analitica e correggere le fluttuazioni. Si possono utilizzare delle equazioni per correggere eventuali interferenze. Tutte le operazioni vengono gestite dal software certificato dello strumento.

Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

La curva di taratura di tipo lineare deve soddisfare i requisiti del D.lgs. 219/2010 (2009/90/CE e 2008/105/CE) e essere adeguata a ricercare concentrazioni inferiori o pari al 30% dello SQA dell'analita in esame. Una volta costruita si deve verificare quotidianamente, e prima di ogni corsa analitica, la correttezza della curva attraverso un bianco di taratura e più punti della curva.

Il software dello strumento determina i numeri di conteggi e la concentrazione dei diversi elementi associata a ogni campione. Il software permette di eseguire la taratura, la correzione sul bianco, la correzione dei conteggi con le equazioni di correzione, determinare la concentrazione degli analiti nelle soluzioni, segnalare le anomalie rispetto ai criteri di controllo stabiliti.

Ogni laboratorio deve mantenere un programma atto all'assicurazione della qualità.

È responsabilità del laboratorio assicurare che il metodo analitico adottato, derivante dall'eventuale combinazione delle tecniche di preconcentrazione e determinazione strumentale menzionate, sia adatto allo scopo e in particolare che sia in grado di soddisfare i requisiti di prestazione analitica riguardo al limite di quantificazione e all'incertezza. Nella verifica iniziale del metodo il laboratorio deve effettuare una valutazione sperimentale almeno dei recuperi e della precisione a concentrazioni diverse, in particolare a quelle corrispondenti al LOQ e allo SQA.

La precisione deve essere verificata inizialmente mediante analisi della ripetibilità sul bianco e sugli standard usati per la taratura. La precisione deve essere valutata mediante delle prove di recupero sugli standard a diversa concentrazione.

A ogni sequenza analitica strumentale o almeno ogni dieci campioni dovrebbero essere effettuati un bianco di procedimento, una prova di recupero e, se possibile, una replica di un campione.

Gli standard di verifica della taratura dovrebbero dare uno scostamento massimo inferiore al 20% della concentrazione nominale, i bianchi, strumentali e di procedimento, dovrebbero dare risultati inferiori ai limiti di quantificazione relativi a ciascun analita.

Ai fini della determinazione della precisione è auspicabile l'utilizzo di materiali di riferimento certificati con matrice simile alla matrice in esame. È bene notare che i materiali di riferimento disponibili per le acque marine sono in numero esiguo e presentano spesso concentrazioni addirittura inferiori ai LOQ richiesti, rendendo difficile il loro utilizzo. I risultati devono essere espressi in $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.u.

Il laboratorio dovrebbe partecipare a esercizi di confronto interlaboratorio sulla matrice specifica per gli analiti specifici.

3.3.10 Determinazione di Hg con DMA-80

Questa metodica permette la determinazione della concentrazione di mercurio presente nel campione in esame in tempi brevi, attraverso la decomposizione termica della matrice seguita dalla rivelazione con assorbimento atomico, senza necessità di pretrattamento (sia sul campione di organismi tal quali che organismi essiccati).

Questo strumento è altamente sensibile e completamente automatizzato, permette la fruizione da parte anche di tecnici non altamente specializzati.

Principio del metodo

In una fornace a riscaldamento controllato, il mercurio viene liberato grazie alla decomposizione della matrice, sia da campioni solidi che umidi che da soluzioni acquose e trasportato attraverso un flusso di

ossigeno a un amalgama che lo trattiene. Tale amalgama per successivo riscaldamento rilascia il mercurio. Il rivelatore effettua quindi la misura del segnale.

Il processo inizia quando il campione posto su una navicella entra nella fornace e viene prima essiccato e poi termicamente e chimicamente decomposto. I prodotti di decomposizione sono trasportati dal flusso di ossigeno alla sezione catalitica del forno. L'ossidazione è completata e gli alogeni e gli ossidi di azoto/zolfo sono intrappolati.

I prodotti di decomposizione rimanenti vengono poi trasportati a una amalgama che intrappola selettivamente mercurio. Dopo il sistema viene lavato con ossigeno per rimuovere eventuali altri gas o prodotti di decomposizione. Quindi l'amalgama viene rapidamente riscaldata, rilasciando vapori di mercurio.

Il flusso di ossigeno porta i vapori di mercurio al rivelatore costituito da spettrofotometro a assorbimento atomico. La misura dell'assorbanza (altezza di picco o area del picco) è misurata a 253.7 nm in funzione della concentrazione di mercurio.

Campo di applicazione

Il campo di lavoro tipico per questo metodo è di 0.05-600 ng. Il limite di rivelabilità di questo metodo è 0.01 ng di mercurio.

Campionamento e conservazione del campione

Le procedure di campionamento sono di pertinenza del committente per il quale il Laboratorio predispone apposite procedure per il corretto campionamento e i contenitori idonei.

Il campione umido deve essere conservato a +4°C e analizzato entro 1 settimana, mentre il campione essiccato deve essere conservato a temperatura ambiente per un massimo di 6 mesi.

Interferenze e cause di errore

Si devono evitare contaminazioni nel corso del processo di campionamento e di analisi. Solventi, reagenti e contenitori per la preparazione possono addurre interferenze alla procedura di analisi. Tutti i materiali devono essere testati al fine di dimostrare di essere privi di interferenti sotto le condizioni di analisi, attraverso l'analisi di bianchi.

Effetti di memoria tra le analisi si possono riscontrare se si analizzano campioni con concentrazioni di mercurio superiori ai 400 ng. In genere, per ridurre al minimo gli effetti di memoria, si consiglia di analizzare i campioni suddivisi in lotti di bassa e alta concentrazione, analizzando sempre per primo quelli a bassa concentrazione. Se questo non è possibile, si consiglia dopo l'analisi di un campione, un'analisi in bianco per un tempo prolungato di decomposizione al fine di limitare effetti di memoria.

Determinazione strumentale

Lo strumento è un analizzatore automatico di mercurio (DMA-80) che necessita di un flusso di gas ossigeno a elevata purezza.

Reagenti e standard

Tutti i reattivi, l'acqua utilizzata per il lavaggio della vetreria e dei materiali utilizzati per la preparazione delle soluzioni devono essere a elevato grado di purezza: l'acqua deve essere ultrapura, priva di interferenze.

Per la soluzione standard di mercurio, si considerano solo soluzioni madre standard (1000 mg/kg) in soluzione acquosa, di elevata purezza ($\geq 99.99\%$).

Le soluzioni di calibrazioni devono essere preparate per diluizione dalle soluzioni standard concentrate di ogni analita in esame a diverse concentrazioni per coprire l'intervallo lineare dello strumento. La stabilità delle soluzioni variano tra 24-48ore dalla preparazione.

Procedimento

I parametri analitici dipendono dalle dimensioni del campione (peso), dal tipo di matrice e dallo strumento specifico. Si consiglia di consultare il manuale d'uso per le raccomandazioni della ditta produttrice. Tempi supplementari o alternativi scelti possono essere determinati attraverso prove durante l'ottimizzazione della metodica utilizzando materiali di riferimento standard che sono appropriati per la matrice di interesse.

Inizialmente si costruisce la curva di taratura, la quale può essere suddivisa in due curve, la prima per basse concentrazioni tra (0.05-30 ng) e la seconda per le alte concentrazioni tra (50 ng-500 ng), oppure può essere unica con concentrazioni che coprono l'intero range, a seconda dello strumento in dotazione.

Per l'analisi del campione, si pesa una quantità di campione omogeneizzato, in una navicella in nichel. Si annota il peso del campione e si introduce la navicella nello strumento. Il campione contenuto nella navicella viene sottoposto a cicli di riscaldamento, il mercurio liberato viene dapprima trattenuto dall'amalgama d'oro e poi rilasciato e misurato nelle celle di misura. Si può leggere il campione umido o essiccato ottimizzando il programma delle temperature.

Per ogni programma si sceglie la durata di essiccamento, di decomposizione e il tempo di concentramento su amalgama, si hanno dei valori prefissati in funzione della quantità di campione. La quantità massima di campione è dipendente dal tipo di navicella utilizzata.

Taratura, qualità del dato e espressione dei risultati

La taratura viene costruita seguendo la procedura riportata dalla ditta produttrice dello strumento. Si può costruire utilizzando soluzioni a concentrazione nota o materiali di riferimento certificati.

Si costruisce la curva di taratura, analizzando almeno in doppio le soluzioni a concentrazione nota di mercurio o la quantità fissa di materiali di riferimento certificati. La curva deve contenere un minimo di 5 punti escluso lo zero e contenere i risultati di 3 bianchi.

Il software permette di costruire la curva e di determinare la concentrazione degli analiti nelle soluzioni.

Ogni laboratorio deve mantenere un programma atto all'assicurazione della qualità. Nella verifica iniziale del metodo il laboratorio deve effettuare una valutazione sperimentale almeno dei recuperi e della precisione a concentrazioni diverse, in particolare a quelle corrispondenti al LOQ e allo SQA.

La precisione deve essere valutata mediante delle prove di recupero sulle concentrazioni standard a diversi livelli.

Di norma si ottengono valori di RSD inferiori al 10%, legati all'omogeneità dei campioni e alla concentrazione di mercurio.

4. BIBLIOGRAFIA

- APHA Methods 3125:2008. Metals by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry.
- CORILA, 2007. Manuale dei metodi analitici per il controllo ambientale di acque e sedimenti della Laguna di Venezia
- EN 16619:2015. Food analysis. Determination of Benzo [a] pyrene, benz [a] anthracene, chrysene and Benzo [b] fluoranthene in foodstuffs by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS).
- EN 16691:2015. Water quality. Determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in whole water samples. Method using solid phase extraction (SPE) with SPE-disks combined with gas chromatography mass spectrometry (GC-MS).
- EPA Method 7000:1992. Atomic absorption methods.
- EPA Method 200.2:1994. Sample Preparation Procedure for Spectrochemical Determination of Total Recoverable Elements.
- EPA Method 7060:1994. Arsenic (atomic absorption, furnace technique).
- EPA Method 7131a:1994. Cadmium (atomic absorption, furnace technique).
- EPA Method 7421:1994. Lead (atomic absorption, furnace technique).
- EPA Method 3050b:1996. Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils.
- EPA Method 3052:1996. Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices.
- EPA Method 7199:1996. Determination of hexavalent chromium in drinking water, groundwater and industrial wastewater effluents by ion chromatography.
- EPA Method 1631e : 2002. Mercury in Water by Oxidation, Purge and Trap, and Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry.
- EPA Method 245.7:2005. Mercury in Water by Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry.
- EPA Method 3051a:2007. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils.
- EPA Method 7473:2007. Mercury in Solids and Solutions by Thermal Decomposition, Amalgamation, and Atomic Absorption Spectrophotometry.
- EPA Method 7474:2007. Mercury in sediment and tissue samples by atomic fluorescence spectrometry.
- EPA 525.3, 2012. Determination of Semivolatile Organic Chemicals in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Capillary Column Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). IRSA-CNR-APAT 5080: Metodi Analitici per le Acque Idrocarburi policiclici aromatici.
- EPA Method 6010d : 2014. Inductively coupled plasma - optical emission spectrometry.
- EPA Method 6020b:2014. Inductively coupled plasma - mass spectrometry.
- EPA Method 7196A:1992. Chromium, hexavalent (colorimetric).
- ICRAM, 2001. Metodologie analitiche di riferimento.
- IRSA-CNR-APAT, 2003. Metodi analitici per le acque, Manuali e linee guida 29/2003.
- ISO 11466:1995 (revisione 2016). Soil quality. Extraction of trace elements soluble in aqua regia.
- ISO 13877:1998. Soil quality. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons. Method using high performance liquid chromatography.
- ISO 17993:2002 (revisione 2013). Water quality. Determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water by HPLC with fluorescence detection after liquid-liquid extraction.
- ISO 15586:2003 (revisione 2014). Water quality. Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace.
- ISO 15587:1 2002 (revisione 2013). Water quality. Digestion for the determination of selected elements in water. Part 1: Aqua regia digestion.
- ISO 15587:2 2002 (revisione 2013). Water quality. Digestion for the determination of selected elements in water. Part 2: Nitric acid digestion.
- ISO 7981-2:2005 (revisione 2014). Water quality. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Part 2: Determination of six PAH by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after liquid-liquid extraction.
- ISO 18287:2006 Soil quality. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Gas chromatographic method with mass spectrometric detection.
- ISO 17852:2006 (revisione 2015). Water quality. Determination of mercury. Method using atomic fluorescence spectrometry.
- ISO 11885:2007 (revisione 2016). Water quality. Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES).

-
- ISO 17852:2008 (revision 2015). Water quality. Determination of mercury. Method using atomic fluorescence spectrometry.
- ISO 22959:2009. Animal and vegetable fats and oils. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by on-line donor-acceptor complex chromatography and HPLC with fluorescence detection.
- ISO 28540:2011. Water quality. Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water. Method using gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS).
- ISO 28581:2012 (revision 2015). Water quality. Determination of selected non-polar substances. Method using gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS).
- ISO 13859:2014. Soil quality. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC).
- ISO 15753:2016. Animal and vegetable fats and oils. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons.
- ISO 17294-2:2016. Water quality. Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Part 2: Determination of 62 elements.
- Smedes F, et al. J Environ Monit. 2000. Determination of (mono-, di- and) tributyltin in sediments. Analytical methods. Environ Monit. 2000 Dec;2(6):541-9.
- US EPA method 8270d, 2014. Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS).



Sistema agenziale
Programma triennale 2014-2016

Processo di validazione del prodotto

Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine
Verifica delle metodologie ufficiali esistenti e la loro applicabilità alle matrici marine

Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine
Idrocarburi Policiclici Aromatici e Metalli

Nota di sintesi per approvazione in Consiglio Federale

Sommario. 1. Informazioni generali – 2. Sintetica descrizione del prodotto – 3. Processo di validazione: punti di forza e punti di debolezza del prodotto – 4. Proposta delibera/raccomandazione/ rapporto tecnico e sperimentazione – 5. Diffusione del prodotto – 6. Eventuale condivisione con soggetti esterni – 7. Parere del responsabile di area

1. Informazioni generali

L'incarico del Gruppo di Lavoro 4 dell'Area 1 "Formazione del dato" previsto dal programma triennale 2014-2016 del Sistema Nazionale di Protezione dell'Ambiente (SNPA) riguardava la definizione di tre linee guida:

1. Linee guida sulle analisi granulometriche dei sedimenti marini
2. Linee guida sui metodi di campionamento delle matrici marine
3. Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine

Diverse sono infatti le direttive europee e le normative nazionali che prevedono il campionamento e le analisi della colonna d'acqua, dei sedimenti e degli organismi marini per la valutazione dello stato chimico dei corpi idrici (Direttiva 2000/60/CE e la Direttiva 2008/105/CE, con i relativi decreti nazionali) e per la caratterizzazione ambientale e/o il monitoraggio di aree costiere soggette a impatto antropico (art. 109 del d.lgs. 152/06: Immersione in mare di materiale derivante da attività di escavo e attività di posa in mare di cavi e condotte; D.M. 7 novembre 2008 relativo alle attività di dragaggio nelle aree marine interne ai SIN; D.M. 173/2016 - Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini).

L'obiettivo dell'attività proposta è quello di fornire delle Linee guida, condivise dal SNPA, da aggiornare periodicamente, a disposizione di tutti i soggetti pubblici e privati che per varie ragioni devono eseguire una caratterizzazione o un monitoraggio ambientale. In particolare queste Linee guida dovranno suggerire metodologie, aggiornate e condivise, di campionamento di matrici marine così come di analisi chimico-fisiche di sedimenti, biota ed acque.

Per le *Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine*, in considerazione del numero di sostanze da prendere in considerazione e delle matrici considerate, dell'introduzione del nuovo Decreto Legislativo 172/2015 che ha reso la determinazione di alcune classi di sostanze più complessa, nonché della difficoltà e dei tempi necessari per raccogliere le informazioni sia presso le agenzie che compongono il gruppo di lavoro che le altre, si è ritenuto più pratico produrre non un unico volume, ma una serie di documenti divisi per classi di sostanze completati da un documento preliminare che riporta una ricognizione generale delle prestazioni delle metodologie analitiche utilizzate dalle agenzie.

2. Sintetica descrizione del prodotto

Il volume *Verifica delle metodologie ufficiali esistenti e la loro applicabilità alle matrici marine* costituisce il documento preliminare ai volumi che compongono le *Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine* risultato dalle attività condotte dal Gruppo di Lavoro n. 4 dell'Area 1 "Formazione del dato" previsto all'interno del programma triennale 2014-2016 del Sistema Nazionale di Protezione dell'Ambiente (SNPA).

L'attività iniziale del gruppo di lavoro è consistita nella raccolta ed elaborazione delle informazioni relative alle metodologie analitiche impiegate dalle agenzie per la determinazione delle sostanze prioritarie per poi proseguire con la stesura delle Linee guida in cui sono descritte le metodologie analitiche impiegabili nel monitoraggio chimico delle tre matrici marine, acque, sedimenti e biota.

L'iniziale raccolta di informazioni, cominciata a marzo 2015 è stata successivamente aggiornata con l'emanazione del Decreto Legislativo n. 172 del 13 ottobre 2015. La raccolta di informazioni ha presentato molte difficoltà perché molte agenzie hanno consegnato con ritardo le informazioni o non le hanno fornite.

L'elaborazione delle informazioni raccolte ha permesso comunque di avere un quadro abbastanza completo delle metodologie effettivamente adottate dalle agenzie per il monitoraggio chimico delle matrici marine e si è ritenuto utile dedicare ad essa un volume specifico.

Nel secondo volume *Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie in matrici marine - Idrocarburi policiclici aromatici e Metalli* sono descritte metodologie analitiche impiegabili nel monitoraggio chimico delle tre matrici marine, acque, sedimenti e biota, per gli analiti previsti dal D.lgs 172/2015 riconducibili a queste classi di contaminanti. Le metodologie descritte derivano da quelle effettivamente adottate dalle agenzie per il monitoraggio chimico delle matrici marine così come prescritto dalla normativa nazionale che recepisce la direttiva quadro sulle acque e le sue successive modifiche. Nella scelta delle metodologie impiegabili si è tenuto conto sia di criteri legati alla capacità delle tecniche di soddisfare le prestazioni analitiche richieste dalla normativa sia di criteri legati alla diffusione reale di tecniche e strumentazioni nei laboratori. Per ogni matrice e per ogni analita o classe di analiti sono descritte le possibili tecniche impiegabili, discutendone limiti e accorgimenti da adottare.

Secondo lo schema di lavoro concordato nel POD e nei successivi aggiornamenti, il lavoro si è svolto attraverso una serie di incontri di discussione per la definizione dei contenuti del documento che successivamente sono stati sviluppati, con il contributo di alcune agenzie.

3. Processo di validazione: punti di forza e punti di debolezza del prodotto

Punto di forza di queste Linee Guida, e di quelle che verranno realizzate, è quello di raccogliere le diverse metodologie che possono essere utilizzate per le diverse classi di sostanze prioritarie per le diverse matrici ambientali, e di farne una ricognizione critica fornendo così alle agenzie utili strumenti nella scelta delle metodologie analitiche più idonee.

I punti di debolezza sono riconducibili alle difficoltà incontrate nel corso dei lavori che non ha permesso di reperire le informazioni complete presso tutte le agenzie. Infatti per la redazione di queste linee solo poche agenzie sono state attive e collaborative e questo ha comportato la realizzazione solo di una parte dei prodotti previsti dal POD.

In seguito a queste difficoltà, anche le altre Linee guida hanno subito ritardi per cui, a parte le *Linee guida sulle analisi granulometriche dei sedimenti marini* che saranno consegnate entro i primi mesi dell'anno 2018, per il completamento di queste Linee guida sulle analisi di sostanze prioritarie e la redazione completa di quelle relative ai

metodi di campionamento delle matrici marine sarebbe necessario che questo GdL prosegua questa attività anche nel prossimo piano triennale.

4. Proposta delibera/raccomandazione/rapporto tecnico e sperimentazione

A seguito di emissione del documento si può prevedere, la pubblicazione dei due volumi come linee guida.

Il GdL rimette alla valutazione del Consiglio la definizione del livello di coerenza che intende dare, ai sensi della L.132/16, alle linee guida tecniche definite nei documenti rassegnati.

5. Diffusione del prodotto

Il documento è pronto per una sua pubblicazione in intranet per una diffusione all'interno del sistema Agenziale anche attraverso dei seminari.

6. Eventuale condivisione con soggetti esterni

Il documento è di sicuro interesse per tutti i soggetti pubblici e privati coinvolti nelle attività analitiche relative a indagini ambientali, in particolar modo quelle che derivano da normative nazionali e/o europee.

7. Trasmissione amministrazioni centrali/territoriali

Le Linee Guida sono di potenziale interesse per il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare nell'ambito della realizzazione delle attività analitiche previste dai decreti D.lgs. 172/2015 – Attuazione della Direttiva 2013/39/UE che modifica le direttive 2000/60/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque e D.lgs. 190/2010 di recepimento della Direttiva Strategia Marina, nonché delle normative nazionali riguardanti la caratterizzazione di aree marine soggette a attività di movimentazione di fondali

8. Parere dei Responsabili di area e del CTP

I Responsabili di area esprimono parere positivo in merito alle linee guida.