Allegato D

Esempi di parametri operativi adatti per l'analisi strumentale degli IPA

Le caratteristiche strumentali e le condizioni operative appresso riportate non sono da considerarsi normative ma come esempi applicativi. P.es., è possibile utilizzare colonne per HPLC di lunghezza, diametro e granulometria diversi, oppure colonne GC capillari DB1-, DB5-, DB1701-simili, con varie combinazioni di lunghezza, diametro interno e spessore di fase.

D.1 HPLC/FLD

- Colonna HPLC: di tipo RP-C_{18}, 250 mm x 4,6 mm ovvero 150 mm x 2.1 mm
- Iniettore: *loop* tarato di precisione da 20 µl, 10µl o 5 µl
- Temperatura dell'alloggiamento: 30 °C ± 1 °C
- Fase mobile: miscela d'acetonitrile e acqua, in gradiente:
  a t = 0 min, acqua 30%, acetonitile 70%;
  a t = 3 min, acqua 25%, acetonitile 75%;
  a t = 10 min, acqua 0%, acetonitrile 100%;
  a t = 15 min, acqua 0%, acetonitrile 100%.
- Velocità di flusso: 1,5, 1,2 o 1,0 ml/min (in ragione delle dimensioni della colonna separativa e del programma analitico ottimizzato)

Tabella D.1 riporta le lunghezze d'onda d'eccitazione e d'emissione adatte per l'identificazione e misura degli IPA.

Tabella D.1 — Esempi di lunghezze d'onda d'emissione e d'eccitazione per l'analisi HPLC degli IPA cancerogeni (λ_e = d'eccitazione; λ_f = d'emissione in fluorescenza)

Composto/i	**$\lambda_{e,1}$ (nm)**	**$\lambda_{f,1}$ (nm)**	**$\lambda_{e,2}$ (nm)**	**$\lambda_{f,2}$ (nm)**
BaA, 6-metilcrisene, crisene	275	390	270	390
BaP, BeP (valide anche per BbF e BkF)	260	415	290	430
DBahA, BPE	297	405	290	430
IP	250	500	370	460
BjF	382	517	300	512
DBaeP	302	394	357	442
DBahP	297	431	329	457

NOTA: Poiché la risposta strumentale ad una λ prefissata dipende dalla natura del composto (può differire per un fattore ≥20 per specie isomere), il limite di rivelabilità deve essere calcolato nelle condizioni operative selezionate.

Per l'analisi HPLC-DAD, si possono selezionare lunghezze d'onda d'assorbimento eguali a 290 nm o 385 nm.

D.2 GC/MSD

D.2.1 Parametri adatti per la separazione GC

- Colonna GC: Colonna capillare in silice fusa di tipo siliconico (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 μm spessore di film, fase 5%fenil,95%metil-polisilossano legato chimicamente al substrato)
- Carrier gas: Elio (con purezza minima 99,999 %)
- Temperatura del forno: Programma di temperatura con doppia rampa:
  iniziale: 120°C for 2 min (solvente: toluene)
  1° gradiente di T: +5°C/min fino a 300°C, + isoterma per 25 min
  2° gradiente di T: 20°C/min fino a 320°C + isoterma per 5 min;
  oppure:
  iniziale: 60 °C for 1.5 min (cloroformio)
  1° gradiente di T: +15°C/min fino a 180 °C, + isoterma per 2 min
  2° gradiente di T: +4°C/min fino a 280°C + isoterma per 20 min
  3° gradiente di T: +10°C/min fino a 300°C + isoterma 5 min.
- Flusso: flusso costante (controllato elettronicamente), 1,0 ml/min
- Modalità d'iniezione: *splitless* o "*cold-on-column*".

D.2.2 Parametri operativi proposti per l'identificazione/quantificazione MSD

D.2.2.1 MS a quadrupolo

- Modalità: *Selected Ion Monitoring* (SIM)
- Temperatura del *transfer line*: 300 °C
- Temperatura dell'*ion source*: superiore a 180 °C
- Energia dell'*ion source* 70 eV

D.2.2.2 MS a trappola ionica

- Temperatura dell'*ion source*: 250 °C
- Temperatura del *transfer line*: superiore a 270 °C
- Modalità: SIM
- Energia dell'*ion source* 70 eV
- *Trap offset*: 10
- Corrente d'emissione: 250 μA
- Ioni di registrazione (m/z) Tabella C.2

I rapporti m/z caratteristici degli IPA target e utilizzabili per l'identificazione e quantificazione sono mostrati in Tabella D.2.

Tabella D.2 — Ioni molecolari e rapporti massa/carica caratteristici (ioni frammento) caratteristici dei sette "IPA cancerogeni" e di congeneri tossici o rilevanti

Composto	ione primario (molecolare)	ione secondario $(m/z)_1$	ione secondario $(m/z)_2$	ione secondario $(m/z)_3$
BaA-d_{12}	242	243	121	
CH-d_{12}	264	265	132	
BaA	228	114	229	226
CH	228	114	229	226
BaP-d_{12}	264	265	132	
PE-d_{12}	264	265	132	
BbF	252	253	126	250
BjF	252	253	126	250
BkF	252	253	126	250

BaP	252	253	126	250
BeP	252	253	126	250
PE	252	253	126	250
BPE-d_{12}	288	289	144	
DBahA-d_{14}	292	293	146	
IP	276	138	274	
DBahA	278	139	279	
BPE	276	138	277	274
CPP	226	227	113	224
5MCH	242	228	216	
CO-d_{12}	312	313	155	
DBaiP-d_{12}	316	317	158	
CO	300	301	150	298
DBaeP	302	303	151	300
DBahP	302	303	151	300
DBaiP	302	303	151	300
DBalP	302	303	151	300

D.3 Interferenze

D.3.1 Metodo basato sull'HPLC/FLD

Il BjF non è mai del tutto separato dal BeP quando s'impiega la miscela acetonitrile/acqua per la separazione degli IPA in HPLC. Anche variando il programma di solvente l'impasse della separazione del BjF non è risolta, poiché esso coeluisce in parte col BbF. Per la sua determinazione sarebbe opportuno l'impiego di due lunghezze d'onda ottimali per l'eccitazione e l'emissione (rispettivamente, λ = 382 nm e 517 nm); in queste condizioni, la coeluizione con il BeP non inficia il risultato analitico del BjF; tuttavia si perde il dato relativo al BeP, che potrebbe interessare. In alternativa, per evitare di duplicare le analisi chimiche al solo scopo di valutare il BjF, si possono impiegare due rivelatori in linea (FD+UV), previa opportuna selezione delle rispettive λ operative. Alle lunghezze d'onda indicate in Tabella D.1 per la misura dei benzopireni e degli altri due benzofluoranteni, la fluorescenza del BjF è trascurabile.

A titolo di esempio, adottando la combinazione di FLD e UVD (DAD) (λ_{ecc} = 260 nm, λ_{em} = 420 nm; λ_{abs} = 224 nm) è possibile identificare e quantificare i tre benzofluoranteni.

Nota: Se si utilizza la tecnica HPLC-FD/UVA, la risposta del benzo[j]fluorantene risulta notevolmente inferiore. Pertanto, il limite di rivelabilità per questo composto per la procedura applicata (qualora si voglia discriminare dagli isomeri BbF e BkF) deve risultare migliore di 0.2 ng/m^3.

D.3.2 Metodo basato sulla GC/MS

Usando una colonna con fase stazionaria DB5, DB5-MS, SE-52, SE-54 o simili (5% difenil, 95% dimetil-polisilossano), tipo comunemente usato per l'analisi degli IPA, prestare speciale attenzione alle interferenze che potrebbero inficiare la determinazione di BaA e DBahA, nonché dei benzofluoranteni.

In particolare:

D.3.2.1 BaA

Il benz[a]antracene potrebbe non essere completamente risolto dal ciclopenta[*cd*]pirene (CPP), molecola di massa 226 il cui ione primario si sovrappone a un possibile ione secondario del BaA

(m/z = M-2), e neppure dal crisene (CH) e/o trifenilene (TR), composti con la stessa massa molecolare del BaA. Infine, anche uno ione secondario del crisene deuterato (CH-d_{12}, massa molecolare 240, [M-12] = 228), se assai più abbondante del BaA, potrebbe interferire. Pertanto, occorre verificare preventivamente che la colonna selezionata, nelle condizioni operative adottate, non presenti interferenze significative nell'analisi del BaA.
Qualora fosse necessario, l'analisi può essere ripetuta utilizzando una fase stazionaria diversa, quali DB-17, DB1701, BPX-50, DB-13, ecc.: fasi con maggiore contenuto di sostituente fenile, o comunque con polarità diversa dalla DB-5. P.es., su una colonna di DB-17 l'eluizione del CPP è ritardata rispetto al BaA.

D.3.2.2 BbF+BjF+BkF

Usando una colonna di tipo DB-5, I tre composti non sono risolti; perciò, vanno quantificati cumulativamente (il loro contenuto è espresso come totale).
I tre BFs possono essere separati, almeno in due gruppi (BbF, BjF+BkF; oppure BbF+BkF, BkF) cambiando colonna capillare, p.es., adottando fasi di tipo DB17, BPX-50 o simili (colonne di DB-17 e DB-1701 lunghe 60 m separano completamente i tre composti: l'isomero BjF è eluito per ultimo). Più di recente, sono state commercializzate colonne in grado di separare tutti e tre gli isomeri (fasi miste o a cristalli liquidi: ci si può riferire ai cataloghi delle Ditte specializzate).

D.3.2.3 DBahA e IP

L'indeno[1,2,3-cd]pirene e il dibenz[a,h]antracene possono apparire non completamente separati (il segnale m/z = 276 corrisponde sia allo ione molecolare dell'IP che allo ione secondario m/z =M-2 del DBahA). Una Colonna di tipo DB-5 riesce a separare completamente le due sostanze, tuttavia il DBahA coeluisce con l'isomero DBacA, fatto che causa la sovrastima del DBahA. Generalmente un altro isomero, il DBajA, non si sovrappone al DBahA.
Se è opportuno, in altre parole se la sovrastima di DBahA è critica per valutare la soddisfazione di requisiti di qualità dell'ambiente, il DBahA può essere separato dalle interferenze utilizzando una Colonna di tipo BPX-50 o DB17; in questo caso il DBahA è anticipato rispetto all'IP e separato dal DBacA, ma occorre prestare attenzione all'IP poiché quest'ultimo coeluisce con il DBacA: il segnale m/z = [M-2] interferisce con lo ione primario dell'IP. Se invece si usa una colonna di tipo DB-17MS, l'IP e il DBahA coeluiscono e il DBacA è separato dalla coppia IP+DBahA.

NOTA: La separazione tra isomeri in linea di principio migliora aumentando la lunghezza della colonna (p.es., utilizzando una "60 m" invece di una "30 m") o diminuendone la larghezza (0.18÷0.20 mm) al fine di aumentare il numero di piatti cromatografici. Tuttavia, questo artificio non sempre è applicabile nella pratica e/o dilata i tempi d'analisi.

NOTA:Le colonne con fasi DB-17MS e BPX-50 sono esempi di prodotti facilmente reperibili in commercio, di tipo universalmente conosciuto e identificate con le rispettive sigle senza alcun riferimento diretto alle Ditte che le producono e/o commercializzano. Colonne di caratteristiche equivalenti che portano altre sigle o etichette commerciali sono reperibili in letteratura e nei cataloghi delle Ditte produttrici e di legali rappresentanti di zona o esclusivi. L'utilizzatore potrà scegliere secondo opportunità il tipo di colonna o i tipi di materiale necessari per l'esecuzione delle analisi.