



RAPPORTI ISTISAN 19|7

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Metodi analitici per il controllo delle acque
da destinare e destinate al consumo umano
ai sensi del DL.vo 31/2001 e s.m.i.**

Metodi chimici

A cura di L. Lucentini, M. Patriarca
per la Sottocommissione del Comitato permanente
di Studio sulle Acque del Ministero della Salute
(ex art. 9 DM 26 marzo 1991)



AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Metodi analitici per il controllo delle acque da destinare e destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001 e s.m.i.

Metodi chimici

A cura di
Luca Lucentini (a), Marina Patriarca (b)
per la Sottocommissione del Comitato permanente
di Studio sulle Acque del Ministero della Salute
(ex art. 9 DM 26 marzo 1991)

*(a) Dipartimento Ambiente e Salute
(b) Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione
e Sanità Pubblica Veterinaria*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
19/7

Istituto Superiore di Sanità

Metodi analitici per il controllo delle acque da destinare e destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001 e s.m.i. Metodi chimici.

A cura di Luca Lucentini, Marina Patriarca per la Sottocommissione del Comitato permanente di Studio sulle Acque del Ministero della Salute (ex art. 9 DM 26 marzo 1991)

2019, x, 187 p. Rapporti ISTISAN 19/7

Il volume raccoglie e indica i metodi analitici idonei alla determinazione dei parametri chimici nelle acque da destinare e destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001 (recepimento della Direttiva Europea 98/83/CE) e successive modifiche. I metodi sono stati elaborati o valutati dalla Sottocommissione del Comitato permanente di Studio sulle Acque del Ministero della Salute (ex art. 9 DM 26 marzo 1991) e pertanto sono considerate come metodi di analisi idonei all'impegno per i controlli sulla qualità delle acque destinate al consumo umano di cui all'art. 11, comma 1, lettera d) del DL.vo 31/2001. Il campo di applicazione dei metodi è riferito ad acque da destinare e destinate a consumo umano, acque minerali naturali, termali e di sorgente, acque sotterranee e superficiali interne, acque utilizzate in produzione primaria e alimentare, acque utilizzate per la produzione di acque di dialisi, acque utilizzate per fini ricreazionali (centri spa, piscine) o per altre destinazioni d'uso, previa dimostrazione dell'ottenimento di prestazioni accettabili per gli analiti alle concentrazioni di interesse. Sono riportati nel volume anche i criteri per l'identificazione dei "gruppi di prove" che possono essere considerati ai fini dell'accREDITAMENTO obbligatorio (per singole prove o gruppi di prove), per i laboratori che eseguono i controlli interni ed esterni ai sensi del Decreto del 14 giugno 2017 in recepimento della Direttiva (UE) 2015/1787.

Parole chiave: Acque da destinare e destinate al consumo umano; Metodi chimici.

Istituto Superiore di Sanità

Analytical methods for water intended for human consumption according to the Italian Legislative Decree 31/2001. Chemical methods.

Edited by Luca Lucentini, Marina Patriarca on behalf of Standing Committee on water established by the Ministry of Health (ex art. 9 DM 26 March 1991)

2019, x, 187 p. Rapporti ISTISAN 19/7 (in Italian)

The volume gathers the analytical methods eligible to determine chemical parameters in water intended for human consumption according to the Legislative Decree 31/2001 (transposition of European Directive 98/83/EC) and its integrations. The methods were developed or evaluated by the Sub commission of the Permanent Study Committee, established at the Ministry of Health (ex article 9 of the Italian Ministerial Decree of March 26, 1991). These methods can be considered as the analytical methods eligible to be used for the controls on the quality of water intended for human consumption (art. 11, comma 1, letter d). The field of application of the methods is specifically referred to water to be destined and destined for human consumption, natural mineral and thermal waters, spring water, inland groundwater and surface water, water to be used for production for water for dialysis and in food production, water for recreational purposes (spas, swimming pools) or water resources of different origin and intended use, after providing the evidence of performance acceptable for analytes at the requested concentrations. Criteria to identify groups of tests to be considered for the purpose of the compulsory accreditation of individual tests or groups of tests by laboratories performing internal and external controls, in accordance with the Italian Decree 17 June 2017– transposing Directive (EU) 2015/1787 –, are also reported in this volume. The report is associated with the volume concerning the microbiological methods, printed in the same series.

Key words: Drinking water; Chemical methods

Per informazioni su questo documento scrivere a: luca.lucentini@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è della Sottocommissione del Comitato permanente di Studio sulle Acque del Ministero della Salute (ex art. 9 DM 26 marzo 1991), i cui componenti dichiarano di non avere conflitti di interesse.

Citare questo documento come segue:

Lucentini L, Patriarca M per la Sottocommissione del Comitato permanente di Studio sulle Acque del Ministero della Salute (ex art. 9 DM 26 marzo 1991) (Ed.). *Metodi analitici per il controllo delle acque da destinare e destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001 e s.m.i. Metodi chimici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2019. (Rapporti ISTISAN 19/7).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Silvio Brusaferrò*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti*



Comitato permanente di studio (ex art. 9, DM 26 marzo 1991)

Sottocommissione di studio “Metodi analitici”
Coordinamento generale

Lucentini L. *Istituto Superiore di Sanità*
 Patriarca M. *Istituto Superiore di Sanità*

luca.lucentini@iss.it
 marina.patriarca@iss.it

Indirizzi e riferimenti normativi

Rossi P. *Ministero della Salute*
 Califano G. *Ministero della Salute*

p.rossi@sanita.it
 g.califano@sanita.it

Sottogruppo di lavoro “Campionamento e gestione dei campioni”

Coordinatore: Achene L. *ISS*

laura.achene@iss.it

Alaimo C. <i>ACEA laboratori SpA</i>	c.alaimo@laboratorispa.it
Baraldi M. <i>Gruppo HERA</i>	manuela.baraldi@aimag.it
Camporesi R. <i>HERA SpA</i>	raffaella.camporesi@gruppohera.it
Coppini R. <i>Acquedotto del Fiora SpA</i>	roberta.coppini@fiora.it
Della Sala S. <i>Gruppo Veritas</i>	s.dellasala@gruppoveritas.it
Drago C. <i>ARPA Lazio</i>	chiara.drago@arpalazio.gov.it
Ferretti E. <i>ISS</i>	emanuele.ferretti@iss.it
Frugis A. <i>ACEA laboratori SpA</i>	a.frugis@laboratorispa.it
Galli M. <i>Valle Umbra Servizi SpA</i>	manuela.galli@vus.it
Galli S. <i>Laboratori Acque SpA</i>	s.galli@acque.net
Giuliani A. <i>ARPA Lazio</i>	alessandra.giuliani@arpalazio.gov.it
Lucentini L. <i>ISS</i>	luca.lucentini@iss.it
Manenti A. <i>Acquedotto Metropolitana Milanese SpA</i>	A.manenti@metropolitanamilanese.it
Mantelli F. <i>già ARPA Toscana</i>	domini.mantelli@gmail.com
Messori R. <i>ARPA Emilia Romagna</i>	rmessori@arpae.it
Miana P. <i>Gruppo Veritas</i>	p.miana@gruppoveritas.it
Morello M. <i>ARPA Piemonte</i>	m.morello@arpa.piemonte.it
Mosca M. <i>ISS</i>	maurizio.mosca@iss.it
Nigro Di Gregorio F. <i>ISS</i>	federica.nigrodigregorio@iss.it
Palumbo F. <i>IREN</i>	franca.palumbo@gruppoiren.it
Polesello S. <i>CNR IRSA</i>	polesello@irsa.cnr.it
Restani G. <i>Valle Umbra Servizi SpA</i>	giuseppe.restani@vus.it
Ropolo L. <i>ARPA Piemonte</i>	l.ropolo@arpa.piemonte.it
Rueca C. <i>ARPA Lazio</i>	carla.rueca@arpalazio.gov.it
Santianni D. <i>Publiacqua SpA</i>	d.santianni@publiacqua.it

Sottogruppo di lavoro “Ammonio, carbonio organico totale, cianuri, colore, conduttività elettrica, disinfettante residuo, durezza, odore, ossidabilità, pH, sapore”

Coordinatore: Messori R. *ARPA Emilia Romagna*

rmessori@arpae.it

Carnevali A. *AIMAG SpA*
 Chirico M. *ISS*
 De Angelis S. *ISS*
 Fiorito M. *ARPA Piemonte*
 Mantelli F. *già ARPA Toscana*

antonella.carnevali@aimag.it
 mattea.chirico@iss.it
 stefania.deangelis@iss.it
 m.fiorito@arpa.piemonte.it
 domini.mantelli@gmail.com

Sottogruppo di lavoro “Antiparassitari”

Coordinatore: Morelli M. ARPA Emilia Romagna

Altemura P. ARPA Toscana
Antoci M.L. ARPA Sicilia
Barbera M. ARPA Sicilia
Bottoni P. ISS
Conte A. ARPA Veneto
Daprà F. ARPA Veneto
Della Sala S. Gruppo Veritas
Falai A. Publiacqua Sp
Ferrieri F ARPA Puglia
Foccardi T. Gruppo Verita
Frugis A. ACEA laboratori SpA
Galli M. Valle Umbra Servizi SpA
Infantino V. ARPA Sicilia
Leoni T. ARPA Marche
Lorenzin M. APPA Trento
Manca M.C. ARPA Campania
Mariotti G. ARPA Marche
Mazzetti M. ARPA Toscana
Morreale F. ARPA Sicilia
Orilisi S. ARPA Marche
Perico A. ARPA Toscana
Pesaresi L. Gruppo HERA
Prete M. ARPA Veneto
Morelli P. Gruppo HER
Restani G. Valle Umbra Servizi SpA
Ramponi M. APP
Rossi Leonella ARPA Emilia Romagna
Sesia E. ARPA Piemonte
Spinelli G. ARPA Toscana
Terrabujo C. ARPA Veneto
Zanon F. ARPA Veneto

marcomorelli@arpae.it

p.altemura@arpat.toscana.it
mantoci@arpa.sicilia.it
barbera@arpa.sicilia.it
paola.bottoni@iss.it
anna.conte@arpa.veneto.it
fdapra@arpa.veneto.it
s.dellasala@gruppoveritas.it
a.falai@publiacqua.it
f.ferrieri@arpa.puglia.it
t.foccardi@gruppoveritas.it
a.frugis@laboratorispa.it
manuela.galli@vus.it
infantino@arpa.sicilia.it
trisperano.leoni@ambiente.marche.it
michele.lorenzin@provincia.tn.it
mc.manca@arpacampania.it
giuseppa.mariotti@ambiente.marche.it
m.mazzetti@arpat.toscana.it
morreale@arpa.sicilia.it
stefano.orilisi@ambiente.marche.it
andrea.perico@asf.toscana.it
lucilla.pesaresi@gruppohera.it
marco.prete@arpa.veneto.it
paolo.morelli2@gruppohera.it
giuseppe.restani@vus.it
mario.ramponi@provincia.tn.it
leonellarossi@arpae.it
e.sesia@arpa.piemonte.it
g.spinelli@arpat.toscana.it
ats@arpa.veneto.it
francesca.zanon@arpa.veneto.it

Sottogruppo di lavoro “Benzene e solventi organici aromatici”

Coordinatore: Bergamini C. ARPA Emilia Romagna

Ballabeni M. ARPA Emilia Romagna
Chiappa A. Metropolitana Milanese SpA
De Felice M. ISS
Della Sala S. Gruppo Verita
Foccardi T. Gruppo Veritas
Frugis A. LaboratoRI SpA (Gruppo ACEA)
Guidotti M. ARPA Lazio
Manenti A. Metropolitana Milanese SpA
Mantelli F. già ARPA Toscana
Mascolo G. CNR-IRSA
Morlino R. ISS
Signorini R. LSP
Vincenzi M. ARPA Piemonte

cbergamini@arpae.it

mballabeni@arpae.it
A.chiappa@metropolitanamilanese.it
marco.defelice@iss.it
s.dellasala@gruppoveritas.it
t.foccardi@gruppoveritas.it
a.frugis@laboratorispa.it
maurizio.guidotti@arpalazio.it
A.manenti@metropolitanamilanese.it
domini.mantelli@gmail.com
giuseppe.mascolo@ba.irsa.cnr.it
roberta.morlino@iss.it
roberto.signorini@asf.toscana.it
m.vincenzi@arpa.piemonte.it

Sottogruppo di lavoro “Cromatografia ionica” (Anioni e Cationi)

Coordinatore: Messori R. <i>ARPA Emilia Romagna</i>	rmessori@arpae.it
Bergamini C. <i>ARPA Emilia Romagna</i>	cbergamini@arpae.it
Bertazzini R. <i>Gruppo HERA</i>	labprimarie.bologna@gruppohera.it
Galli M. <i>Valle Umbra Servizi SpA</i>	manuela.galli@vus.it
Galli R. <i>AIMAG SpA</i>	raffaella.galli@aimag.it
Maresca D. <i>ISS</i>	daniela.maresca@iss.it
Masini M. <i>ARPA Toscana</i>	m.masini@arpat.toscana.it
Morelli P. <i>Gruppo HERA</i>	paolo.morelli2@gruppohera.it
Mosca M. <i>ISS</i>	maurizio.mosca@iss.it
Murtas S. <i>ISS</i>	susanna.murtas@iss.it
Piselli S. <i>Gruppo HERA</i>	spiselli@gruppohera.it
Polesello S. <i>CNR IRSA</i>	polesello@irsa.cnr.it
Restani G. <i>Valle Umbra Servizi SpA</i>	giuseppe.restani@vus.it
Segatori M. <i>Laboratori SpA (Gruppo ACEA)</i>	m.segatori@aceaspa.it
Veschetti E. <i>ISS</i>	enrico.veschetti@iss.it
Zanon F. <i>ARPA Veneto</i>	fzanon@arpa.veneto.it

Sottogruppo di lavoro “Cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa” (Cianotossine, interferenti endocrini, contaminanti emergenti)

Coordinatori: Bogialli S. <i>Università di Padova (Padova)</i>	sara.bogialli@unipd.it
Polesello S. <i>CNR IRSA (Milano)</i>	polesello@irsa.cnr.it
Altemura P. <i>ARPA Toscana</i>	p.altemura@arpat.toscana.it
Antoci M.L. <i>ARPA Sicilia</i>	mantoci@arpa.sicilia.it
Bergamini C. <i>ARPA Emilia Romagna</i>	cbergamini@arpae.it
Biagioli S. <i>ACEA laboratori SpA</i>	s.biagioli@laboratorispa.it
Chiappa A. <i>Metropolitana Milanese SpA</i>	A.chiappa@metropolitanamilanese.it
Cinti M. <i>HERA SpA</i>	laborganica.bologna@gruppohera.it;
Daprà F. <i>ARPA Veneto</i>	fdapra@arpa.veneto.it
Della Sala S. <i>Gruppo Veritas</i>	s.dellasala@gruppoveritas.it
Di Pofi G. <i>ISS</i>	giorgia.dipofi@iss.it
Falai A. <i>Publiacqua SpA</i>	a.falai@publiacqua.it
Fant M. <i>Acque del Chiampospa</i>	fantm@acquedelchiampospa.it
Fantozzi L. <i>ARPA Lazio</i>	luca.fantozzi@arpalazio.it
Ferretti E. <i>ISS</i>	emanuele.ferretti@iss.it
Foccardi T. <i>Gruppo Veritas</i>	t.foccardi@gruppoveritas.it
Fornasari C. <i>ARPA Emilia Romagna</i>	cfornasari@arpae.it
Frugis A. <i>Laboratori SpA (Gruppo ACEA)</i>	a.frugis@laboratorispa.it
Fuscoletti V. <i>ISS (Roma)</i>	valentina.fuscoletti@iss.it
Infantino V. <i>ARPA Sicilia</i>	infantino@arpa.sicilia.it
Lauretta G. <i>ARPA Sicilia</i>	glauretta@arpa.sicilia.it
Maggioni S. <i>Metropolitana Milanese SpA</i>	s.maggioni@metropolitanamilanese.it
Mascolo G. <i>CNR-IRSA</i>	giuseppe.mascolo@ba.irsa.cnr.it
Mazzetti M. <i>ARPA Toscana</i>	m.mazzetti@arpat.toscana.it
Nigro Di Gregorio F. <i>ISS</i>	federica.nigro digregorio@iss.it
Pellizzaro A. <i>Acque del Chiampospa</i>	pellizzaroa@acquedelchiampospa.it
Polati S. <i>ARPA Piemonte</i>	s.polati@arpa.piemonte.it
Raffo E. <i>IREN</i>	Enrico.Raffo@iaglaboratori.it
Rossi Leonella <i>ARPA Emilia Romagna</i>	leonellarossi@arpae.it
Spinelli G. <i>ARPA Toscana</i>	g.spinelli@arpat.toscana.it
Zanon F. <i>ARPA Veneto</i>	fzanon@arpa.veneto.it

Sottogruppo di lavoro “ Benzo(a)pirene e idrocarburi policiclici aromatici”, Policlorobifenili

Coordinatore: Bergamini C. ARPA Emilia Romagna cbergamini@arpae.it

Croce G. ARPA Toscana g.croce@arpat.toscana.it
Della Sala S. Gruppo Veritas s.dellasala@gruppoveritas.it
Di Rosa S. ARPA Campania s.dirosa@arpacampania.it
Ercoli R. ACEA laboratori SpA r.ercoli@laboratorispa.it
Foccardi T. Gruppo Veritas t.foccardi@gruppoveritas.it
Frugis A. ACEA laboratori SpA a.frugis@laboratorispa.it
Galli M. Valle Umbra Servizi SpA manuela.galli@vus.it
Guidotti M. ARPA Lazio maurizio.guidotti@arpalazio.it
Mainolfi P. ARPA Campania p.mainolfi@libero.it
Mascolo G. CNR-IRSA giuseppe.mascolo@ba.irsas.cnr.it
Pozzi N. ARPA Piemonte n.pozzi@arpa.piemonte.it
Restani G. Valle Umbra Servizi SpA giuseppe.restani@vus.it
Scaroni I. ARPA Emilia Romagna iscaroni@arpae.it

Sottogruppo di lavoro “Amianto”

Coordinatore: Bruni B. ISS biagio.bruni@iss.it

Bacci T. ARPA Emilia Romagna tbacci@arpae.it
Campopiano A. INAIL a.campopiano@inail.it
Carai A. CRA Lazio a.carai@asl.vt.it
Cavariani F. CRA Lazio labig@asl.vt.it
Crispino A. ARPA Basilicata aldo.crispino@arpab.it
Fornaciai G. Esperto gabriele.fornaciai@hotmail.it
Mainolfi P. ARPA Campania p.mainolfi@libero.it
Martinelli C. ARPA Veneto cmartinelli@arpa.veneto.it
Nasci D. HERA SpA daniele.nasci@gruppohera.it
Prandi S. ARPA Liguria sonja.prandi@arpal.gov.it
Soldani R. AIMAG SpA rita.soldani@aimag.it
Somigliana A. ARPA Lombardia a.somigliana@arpalombardia.it
Trova C. ARPA Piemonte c.trova@arpa.piemonte.it

Sottogruppo di lavoro “Validazione”

Coordinatore: Patriarca M. ISS marina.patriarca@iss.it

Agostini L. HERA SpA luciano.agostini@gruppohera.it
Anichini B. Publiacqua SpA b.anichini@publiacqua.it
Barone F. ARPA Campania f.barone@arpacampania.it
Costantino G. SMAT giovanni.costantino@smatorino.it
De Angelis S. ISS stefania.deangelis@iss.it
Fantozzi L. ARPA Lazio luca.fantozzi@arpalazio.it
Fava A. ARPA Emilia Romagna afava@arpae.it
Foccardi T. Gruppo Veritas t.foccardi@gruppoveritas.it
Giuliani A. ARPA Lazio alessandra.giuliani@arpalazio.gov.it
Gramellini C. ARPA Emilia Romagna cgramellini@arpae.it
Mantelli F. già ARPA Toscana domini.mantelli@gmail.com
Maresca D. ISS daniela.maresca@iss.it
Miana P. Gruppo Veritas p.miana@gruppoveritas.it
Morelli M. ARPA Emilia Romagna marcomorelli@arpae.it
Morello M. ARPA Piemonte m.morello@arpa.piemonte.it

Morelli P. *Gruppo HERA*
Mosca M. *ISS*
Pettine P. *ISS*
Semeraro A. *ISS*
Stacchini P. *ISS*
Vincenzi M. *ARPA Piemonte*

paolo.morelli2@gruppohera.it
maurizio.mosca@iss.it
paola.pettine@iss.it
antonella.semeraro@iss.it
paolo.stacchini@iss.it
m.vincenzi@arpa.piemonte.it

Sottogruppo di lavoro “Editing”

Coordinatore: Cerroni M. *ISS*

mario.cerroni@iss.it

Bottoni P. *ISS*
Patriarca V. *ISS*
Sette C. *ISS*

paola.bottoni@iss.it
valeria.patriarca@iss.it
clara.sette@iss.it

Organizzazione tecnico-scientifica:

Cerroni M. *ISS*

mario.cerroni@iss.it

INDICE

Acronimi	xix
Introduzione e campo di applicazione	1
Accreditamento dei laboratori di prova per le acque destinate al consumo umano: definizione di gruppi di prove	2
0. Premessa	2
1. Obiettivo e campo di applicazione	2
2. Definizione dei gruppi di prove	3
3. Criteri per la selezione dei metodi da accreditare nell'ambito di "gruppi di prove"	3
Metodi e procedure idonei	7

PARTE A

Sintesi dei Metodi ISS idonei al soddisfacimento dei requisiti di cui al DL.vo 31/2001

Acrilammide: metodo ISS.CBA.001.rev.00	19
Alluminio: metodo ISS.DAA.018.rev.00	19
Alluminio, boro, cadmio, cromo, ferro, manganese, nichel, piombo, rame, sodio, vanadio: metodo ISS.DBA.035.rev.00	19
Ammonio: metodo ISS.BHE.019.rev.00	20
Antimonio: metodo ISS.DAA.002.rev.00	21
Antiparassitari: metodo ISS.CAC.015.rev.01	21
Argento: metodo ISS.DAA.045.rev.00	21
Arsenico, antimonio e selenio: metodo ISS.DBB.034.rev.00	22
Arsenico: metodo ISS.DAA.003.rev.00	22
Bario: metodo ISS.DAA.046.rev.00	22
Benzene e altri VOC: metodi ISS.CAA.004.rev.01 e ISS.CAD.004.rev.00	23
Benzo(a)pirene e IPA: metodo ISS.CAB.039.rev.01	24
Boro: metodo ISS.BHA.005.rev.00	24
Boro: metodo ISS.BHB.005.rev.00	25
Bromato: metodo ISS.CBB.006.rev.00	25
Bromuro, clorito, cloruro, fluoruro, fosfato, ioduro, nitrato, nitrito, solfato: metodo ISS.CBB.037.rev.00	25
Cadmio: metodo ISS.DAA.007.rev.00	26
Calcio: metodo ISS.BEC.041.rev.00	26
Calcio, litio, magnesio, potassio, sodio: metodo ISS.CBB.038.rev.00	27
Carbonio organico totale: metodo ISS.BIA.029.rev.00	27
Cianuri totali: metodo ISS.BHC.010.rev.00	27
Cloro libero e cloro totale: metodo ISS.BHD.033.rev.00	28
Cloruro: metodo ISS.BEA.020.rev.00	28
Cobalto: metodo ISS.DAA.048.rev.00	28
Composti organoalogenati volatili: metodo ISS.CAA.036.rev.00	29
Composti perfluoroalchilici: metodo ISS.CBA.051.rev.00	29

Composti perfluoroalchilici: metodo ISS.CBA.052.rev.00	30
Conduttività elettrica: metodo ISS.BDA.022.rev.00	31
Cromo: metodo ISS.DAA.008.rev.00.....	31
Durezza totale: metodo ISS.BEC.031.rev.00.....	32
Ferro: metodo ISS.DAA.024.rev.00	32
Glifosato, glufosinato e AMPA in acqua destinata al consumo umano: metodo ISS.CBA.049.rev.00.....	32
Glifosato, glufosinato e AMPA in acqua destinata al consumo umano, superficiale e sotterranea: metodo ISS.CBC.001.rev.00.....	33
Glifosato e AMPA in acqua destinata al consumo umano: metodo ISS.CBA.050.rev.00.....	33
Manganese: metodo ISS.DAA.025.rev.00.....	34
Mercurio: metodo ISS.DAB.013.rev.00	34
Microcistine: metodo ISS.BGA.044.rev.00.....	34
Microcistine: metodo ISS.CBA.044.rev.00	35
Microcistine: metodo ISS.CBA.053.rev.00	35
Nichel: metodo ISS.DAA.014.rev.00	36
Ossidabilità al permanganato: metodo ISS.BEB.027.rev.00	36
PCB: metodo ISS.CAA.037.rev.00	36
pH: metodo ISS.BCA.023.rev.00	38
Piombo: metodo ISS.DAA.012.rev.00	38
Rame: metodo ISS.DAA.009.rev.00	38
Residuo fisso a 180°C: metodo ISS.BFA.032.rev.00	39
Selenio: metodo ISS.DAA.016.rev.00.....	39
Solidi indisciolti: metodo ISS.BFA.042.rev.00	39
Temperatura: metodo ISS.BBA.043.rev.00.....	39
Torbidità: metodo ISS.BLA.030.rev.00.....	40
Vanadio: metodo ISS.DAA.017.rev.00	40
Zinco: metodo ISS.DAA.049.rev.00	40

PARTE B

Metodi ISS revisionati e di nuova emissione

ISS.CAC.015.REV01. Antiparassitari: metodo SPE-GC (Parte A) e metodo LC-HRMS (Parte B)	43
ISS.CAA.004.REV01. Benzene e altri VOC: metodo HS-SPME e GC-MS	74
ISS.CAB.039.REV01. Benzo[a]pirene e IPA: metodo SPME-GC-MS.....	86
ISS.PGA.901.REV01. Prelievo e conservazione dei campioni	99
ISS.CAA.037.REV00. PCB: metodo AUTO-SPME-HS-GC-MSMS	110
ISS.CBA.049.REV00. Glifosato, glufosinato e AMPA: metodo in derivatizzazione con FMOC-Cl, separazione con LC-HRMS e in LC-MSMS	120
ISS.CBA.050.REV00. Glifosato, AMPA e glufosinato ammonio: metodo in derivatizzazione pre-colonna con ACCQ™-TAG e analisi strumentale in UPLC™-MSMS	134
ISS.CBA.051.REV00. Composti perfluoroalchilici: metodo LC-HRMS (iniezione diretta).....	142
ISS.CBA.052.REV00. Composti perfluoroalchilici: metodo LC-MSMS (iniezione diretta).....	151
ISS.CBC.001.REV00. Glifosato, AMPA e glufosinato: metodo IC-HRMS (iniezione diretta).....	162
ISS.CBA.053.REV00. Microcistine: metodo LC-MSMS.....	172
Metodo di screening multielementare ICP-MS: analisi semiquantitativa	184

ACRONIMI

AAS	<i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>
APAT	<i>Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i servizi Tecnici</i>
APHA	<i>American Public Health Association</i>
CAD	<i>Collision Gas</i>
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CE	<i>Collision Energy</i>
CEN	<i>Comitato europeo di normazione</i>
CUR	<i>Curtain Gas</i>
CFA	<i>Continuous flow analysis</i>
CNV	<i>Cone Voltage</i>
CV	<i>Coefficiente di variazione</i>
CV-AAS	<i>Cold vapor - Atomic Absorption Spectroscopy</i>
CV-AFS	<i>Cold vapor - atomic fluorescence spectroscopy</i>
CXP	<i>Collision Exit Potential</i>
d.i.	<i>Diametro interno</i>
DIN	<i>Deutsches Institut für Normung</i>
DP	<i>Declustering Potential</i>
EDTA	<i>Ethylene Diamine Triacetic Acid</i>
EP	<i>Entrance Potential</i>
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i>
ET-AAS	<i>Electrothermal - Atomic Absorption Spectroscopy</i>
F-AAS	<i>Flame - Atomic Absorption Spectroscopy</i>
FIA	<i>Flow injection analysis</i>
FP	<i>Focusing Potential</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GC-ECD	<i>Gas Chromatography - Electron Capture Detector</i>
GC-FID	<i>Gas Chromatography - Flame Ionization Detector</i>
GC-FLD	<i>Gas Chromatography - Fluorescence Detector</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i>
GC-NPD	<i>Gas Chromatography - Nitrogen Phosphorus Detector</i>
GS	<i>Ion Source Gas</i>
HDPE	<i>High Density Polyethylene (polietilene ad alta densità)</i>
HG-AAS	<i>Hydride Generation - Atomic Absorption Spectroscopy</i>
HPLC-FLD	<i>High Performance Liquid Chromatography - Fluorescence Detector</i>
HPLC-HRMS	<i>High Performance Liquid Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-MS	<i>High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i>
HPLC-MSMS	<i>High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i>
HPLC-UV	<i>High Performance Liquid Chromatography - Ultraviolet detector</i>
HRGC-HRMS	<i>High Resolution Gas Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry</i>
HRGC-LRMS	<i>High resolution gas chromatography - low resolution mass spectrometry</i>
HS-GC	<i>Head Space - Gas Chromatography</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	<i>Ion Chromatography</i>
IC-UV-Vis	<i>Ion Chromatography – Ultraviolet-Visible detector</i>
IC-HRMS	<i>Ion Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry</i>
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry</i>
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy</i>
IPA	<i>Idrocarburi policiclici aromatici</i>
IRSA-CNR	<i>Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche</i>

IS	<i>Internal Standard</i>
ISV	<i>Ion Spray Voltage</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MaSp	<i>Matrix Spike</i>
NfM	<i>Nefelometria</i>
N,N-DPD	<i>N,N-Diethyl-p-phenylenediamine</i>
NTU	<i>Nephelometric Unit</i>
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
PCB	<i>Policlorobifenili</i>
PDMS	<i>Polidimetilsilossano</i>
PE	<i>Polietilene</i>
PEEK	<i>Polyether ether ketone (polietere etere chetone)</i>
PET	<i>Polietilentereftalato</i>
PFAS	<i>Perfluoroalkyl Substance (sostanza perfluoroalchilica)</i>
PP	<i>Polipropilene</i>
PRM	<i>Parallel reaction monitoring</i>
PTFE	<i>Politetrafluoroetilene</i>
P&T	<i>Purge and Trap</i>
R	<i>Recovery (Recupero)</i>
RF	<i>Response Factor</i>
RFIC	<i>Reagent Free Ion Chromatograph</i>
RSD	<i>Relative Standard Deviation (deviazione standard relativa)</i>
SIM	<i>Single ion monitoring</i>
SPE	<i>Solid-phase extraction</i>
SpF	<i>Spettrofotometria</i>
SPME	<i>Solid-phase micro extraction</i>
S_r	<i>Scarto tipo di Ripetibilità</i>
S_R	<i>Scarto tipo di Riproducibilità</i>
STD	<i>Standard Deviation (Deviazione Standard)</i>
TEM	<i>Capillary temperature</i>
TIS	<i>Turbo Ion Spray</i>
T_r	<i>Tempo di ritenzione</i>
TOC	<i>Apparecchiatura per la misura del Total Organic Carbon (carbonio organico totale)</i>
TPX™	<i>Polimetilpentene</i>
U	<i>Uncertainty (Incertezza)</i>
UHPLC-MSMS	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i>
UHPLC-HRMS	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry</i>
u.a.	<i>unità arbitrarie</i>
u.m.a.	<i>unità di massa atomica</i>
UPLC™-MSMS	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i>
U.S. EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
UV-Vis	<i>Ultraviolet-Visible</i>
VOC	<i>Volatile Organic Compounds</i>
WHO	<i>World Health Organization (Organizzazione Mondiale della Sanità)</i>
δi	<i>Scarto tipo di ripetibilità intermedia</i>

INTRODUZIONE E CAMPO DI APPLICAZIONE

La Direttiva 98/83/CE, recepita in Italia con il DL.vo 2 febbraio 2001 n. 31 e successive modifiche e integrazioni (DL.vo 2 febbraio 2002 n. 27) stabilisce le caratteristiche di qualità essenziali per tutte le acque, trattate o non trattate, destinate a uso potabile o per la preparazione di cibi in ambito domestico e tutte le acque utilizzate in imprese alimentari per la produzione, il trattamento, la conservazione o l'immissione sul mercato di prodotti o sostanze destinate al consumo umano.

Al fine di garantire l'idoneità dei dati analitici alle finalità del monitoraggio e alla stima dell'esposizione, e per assicurare l'affidabilità e la comparabilità dei risultati nell'ambito dei controlli interni ed esterni, è previsto l'utilizzo di metodi analitici idonei all'analisi di acque destinate al consumo umano e l'adozione di procedure di controllo analitico della qualità. In tale contesto, e in linea di continuità con i lavori intrapresi nell'ambito del Comitato Permanente di Studio sulle acque presso il Ministero della Salute (ex art 9, DM 26 marzo 1991) - 2^a Sottocommissione di Studio "Metodi analitici", questo Istituto ha predisposto, ai sensi dell'art. 11, comma 1, lettera d) del DL.vo 31 del 2001, i metodi di analisi idonei ai controlli sulla qualità delle acque destinate al consumo umano ai sensi della vigente normativa.

Nell'ambito di tale mandato è stato realizzato il presente rapporto che raccoglie le procedure e i metodi chimici idonei all'attuazione delle attività analitiche di controllo della qualità delle acque destinate al consumo umano. Il rapporto sarà affiancato da un'analoga pubblicazione relativa ai metodi microbiologici prodotta all'interno della stessa serie.

I metodi analitici chimici e le procedure contenute nel volume si riferiscono a tutti i controlli previsti in allegato I parte B e C del decreto, e sono inoltre utilizzabili per il monitoraggio di alcuni parametri addizionali ad oggi non regolamentati che possono rivestire un carattere di particolare interesse sanitario ed emergenza, soprattutto nell'ambito dell'analisi di rischio implementata attraverso i Piani di sicurezza dell'acqua.

Il campo di applicazione dei metodi riportati nel presente volume è riferito ad acque da destinare e destinate a consumo umano, acque minerali naturali, termali e di sorgente, acque sotterranee e superficiali interne, acque utilizzate in produzione primaria e alimentare, acque utilizzate per la produzione di acque di dialisi, acque utilizzate per fini ricreazionali (centri spa, piscine) o acque con altre destinazioni d'uso, previa dimostrazione dell'ottenimento di prestazioni accettabili per gli analiti alle concentrazioni di interesse: è infatti responsabilità dell'utilizzatore dimostrare l'idoneità del metodo ai livelli di concentrazione di interesse e nelle matrici di interesse rispetto alle specifiche riportate.

Dopo un capitolo dedicato alla definizione di gruppi di prove per l'accreditamento dei laboratori di prova per le acque destinate al consumo umano e un capitolo su specifiche sinossi contenenti liste non esaustive di metodi idonei al controllo dei parametri chimici e indicatori delle acque destinate al consumo umano, il volume è articolato nelle seguenti parti:

- *Parte A*
Sintesi dei metodi ISS idonei al soddisfacimento dei requisiti di cui al DL.vo 31/2001;
- *Parte B*
Metodi ISS revisionati e di nuova emissione.

ACCREDITAMENTO DEI LABORATORI DI PROVA PER LE ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO: DEFINIZIONE DI GRUPPI DI PROVE

0. Premessa

In base al DM 14 giugno 2017, i laboratori, o i terzi che ottengono appalti dai laboratori, applicano pratiche di gestione della qualità conformi a quanto previsto dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 o da altre norme equivalenti internazionalmente riconosciute e devono essere accreditati in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 recante «Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura» da un ente di accreditamento designato da uno Stato membro dell'Unione europea, ai sensi del Regolamento (CE) 765/2008.

L'accREDITAMENTO e la valutazione dei laboratori di prova riguardano singole prove o gruppi di prove e deve essere conseguito entro il 31 dicembre 2019.

1. Obiettivo e campo di applicazione

Nel contesto sopra definito è necessario assicurare la qualità dei dati dei controlli di cui al DL.vo 31/2001 e s.m.i., supportando, ove necessario, un processo di accreditamento UNI CEI EN ISO/IEC 17025 graduale e sostenibile per i laboratori, in un periodo transitorio di 24 mesi. A tal fine, vengono di seguito definiti i "gruppi di prove" e indicati i requisiti minimi in base ai quali l'accREDITAMENTO da parte del laboratorio di almeno un metodo o di una combinazione di metodi specifico/a, per ogni gruppo di prova, è considerato adeguato, in via transitoria, a garantire la competenza tecnica del laboratorio a eseguire altre prove comprese nello stesso gruppo.

Le indicazioni fornite sono finalizzate a supportare in regime transitorio il percorso dei laboratori per l'accREDITAMENTO UNI CEI EN ISO/IEC 17025 delle prove.

Al termine del periodo transitorio, l'accREDITAMENTO del laboratorio, anche con scopo flessibile, dovrà comprendere tutte le prove che effettua relative ai controlli dei parametri del DL.vo 31/2001 e s.m.i. almeno per i parametri per cui sono previste le caratteristiche di prestazione minima di cui alla Tabella 1 dell'Allegato III del DL.vo 31/2001 e s.m.i.*. Si intende quindi che un laboratorio potrà, in fase transitoria, accREDITARE progressivamente o contemporaneamente uno o più gruppi di prove, mediante l'accREDITAMENTO di almeno un metodo per ciascun gruppo, con l'obiettivo di accREDITARE al termine del periodo di transizione tutte le prove, almeno per i parametri per cui sono previste le caratteristiche di prestazione minima indicate in Tabella 1 dell'Allegato III del DL.vo 31/2001 e s.m.i. Si specifica in questo senso che l'accREDITAMENTO per gruppi di prove non esclude la possibilità d'integrazione: qualora un laboratorio disponesse già di metodi accREDITATI per un certo numero di parametri, potranno essere accREDITATI al minimo i gruppi di prove necessari al fine di esaurire i restanti parametri nell'ambito del periodo transitorio.

L'accREDITAMENTO di uno o più gruppi di prove nel periodo transitorio è una scelta del laboratorio e non è richiesto un numero minimo di prove o gruppi di prove da accREDITARE.

* Si sottolinea che non risulterà necessario l'accREDITAMENTO per il parametro *ossidabilità* qualora il laboratorio di prova risultasse già accREDITATO per il parametro *Carbonio organico totale*, come previsto nella nota 4 nell'allegato I parte C.

2. Definizione dei gruppi di prove

Per l'aggregazione dei gruppi di prova si è tenuto conto dei seguenti elementi:

- tecniche analitiche strumentali e tecniche analitiche classiche non strumentali correntemente in uso per l'analisi di acqua destinata al consumo umano;
- tecniche di misura delle caratteristiche chimico-fisiche;
- tecniche analitiche correntemente in uso, tenendo conto dei metodi di prova accreditati per i parametri di cui all'allegato I parte B e C del DL.vo 31/01;
- parametri oggetto dei controlli e loro significato tossicologico;
- capacità di determinare simultaneamente un numero quanto più ampio possibile di parametri del gruppo di prove specifico (carattere multiparametrico).

Su tali basi sono stati individuati i seguenti gruppi di prove:

1. Gruppo di prove basate sulle tecniche di cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa (Tabella 1);
2. Gruppo di prove basate sulle tecniche di cromatografia liquida con sistemi di rivelazione convenzionali (Tabella 2);
3. Gruppo di prove basate sulle tecniche di gascromatografia associata alla spettrometria di massa (Tabella 3);
4. Gruppo di prove basate sulle tecniche di gascromatografia con sistemi di rivelazione convenzionali (Tabella 4);
5. Gruppo di prove basate sulle tecniche di cromatografia ionica (Tabella 5);
6. Gruppo di prove basate sulle tecniche di spettrometria di massa e di spettrofotometria non associate a tecniche cromatografiche, generalmente impiegate per l'analisi di elementi in traccia (Tabella 6);
7. Gruppo di prove basate sulle tecniche spettrofotometriche, titrimetriche, elettrochimiche, ottiche, chimico-fisiche non associate a tecniche cromatografiche (Tabella 7).

L'aggregazione delle prove nelle diverse categorie è funzionale al controllo dei parametri chimici e chimico-fisici dell'allegato I parte B e C, come pure la ricerca di elementi e sostanze chimiche diverse, tra i quali sostanze "emergenti" che i laboratori sono chiamati a controllare in forza della analisi di rischio (piano di sicurezza dell'acqua) di cui al DM 14 giugno 2017.

3. Criteri per la selezione dei metodi da accreditare nell'ambito di "gruppi di prove"

Nel quadro dei controlli previsti per i laboratori preposti ai controlli di cui al DM 14 giugno 2017 sono adottati i seguenti criteri di definizione per i metodi da accreditare, al minimo, nell'ambito di ciascun gruppo di prove che il laboratorio sceglie di accreditare:

1. l'accREDITAMENTO UNI CEI EN ISO/IEC 17025 da parte del laboratorio di almeno un metodo, come indicato di seguito per un gruppo di prova, è considerato adeguato a garantire la competenza tecnica del laboratorio a eseguire altre prove comprese in quello stesso gruppo di prove per i controlli di cui al DM 14 giugno 2017, purché sia soddisfatta la condizione (2);

2. i metodi di prova impiegati dal laboratorio nell'ambito dei controlli del DL.vo 31/2001 e s.m.i. devono essere stati validati/verificati e utilizzati con risultati soddisfacenti nel corso di almeno un confronto interlaboratorio nell'ultimo anno.

Ove sono previsti più metodi è sufficiente accreditarne uno per soddisfare il criterio di selezione sopra definito.

Le Tabelle 1-7 riportano i metodi individuati per i corrispondenti gruppi di prove.

Tabella 1. Gruppo di prove per tecniche di cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa

Tecniche analitiche	Criteri minimi
	Accreditamento di almeno uno dei seguenti metodi*
<i>LC-HRMS</i>	ISS CBA.049 (tecniche: LC-HRMS; LC-MSMS)
<i>LC-MS</i>	ISS CBC.001 (tecnica: LC-HRMS)
<i>LC-MSMS</i>	ISS.CBA.050 (tecnica: UPLC™-MSMS)
<i>LC-HRMS</i>	ISS CBA.001.rev.00 (tecnica: LC-MS) + 1 metodo per il parametro
<i>UPLC™-MSMS</i>	Glifosato

* o altro metodo, compreso metodo interno, basato sulla stessa tecnica analitica (vedi Sinossi delle procedure e dei metodi accreditati), in grado di determinare simultaneamente più parametri di cui al gruppo di prove

Tabella 2. Gruppo di prove per tecniche di cromatografia liquida non associata alla spettrometria di massa

Tecniche analitiche	Criteri minimi
	Accreditamento di almeno uno dei seguenti metodi*
<i>LC-FLD</i>	APAT/CNR-IRSA 5060 (tecnica: LC-UV)
<i>LC-UV</i>	APAT/CNR-IRSA 5080 (tecnica: LC-FLD)

* o altro metodo compreso metodo interno, basato sulla stessa tecnica analitica (vedi Sinossi delle procedure e dei metodi accreditati), in grado di determinare simultaneamente più parametri di cui al gruppo di prove

Tabella 3. Gruppo di prove per tecniche di gascromatografia associata alla spettrometria di massa

Tecniche analitiche	Criteri minimi
	Accreditamento di almeno uno dei seguenti metodi**
<i>AUTO-SPME-HS GC-MSMS</i>	
<i>GC-MS</i>	
<i>GC*</i>	
<i>GC-HRMS</i>	ISS CAA.037 (tecnica: AUTO-SPME-HS GC-MSMS)
<i>GC-LRMS</i>	EPA 1668C (tecnica: GC-HRMS)
<i>HS-GC (dinamico)*</i>	EPA 5021A (tecnica: HS-GC*)
<i>HS-GC (statico) - MS</i>	EPA 5030C (tecnica: P&T GC*)
<i>HS-GC*</i>	ISO 28540 (tecnica: GC-MS) + metodo/i per i parametri 1,2-
<i>HS-SPME-GC-MS</i>	dicloroetano ed epicloridrina
<i>P&T GC-MS</i>	
<i>P&T GC*</i>	
<i>SPME-GC-MS</i>	
<i>SPME-GC-MS*</i>	

* tali tecniche sono associate a metodi che possono indifferentemente applicare un analizzatore di massa o di altra tipologia; in questo caso ci si riferisce al metodo associato alla spettrometria di massa

** o altro metodo compreso metodo interno, basato sulla stessa tecnica analitica (vedi Sinossi delle procedure e dei metodi accreditati), in grado di determinare simultaneamente più parametri di cui al gruppo di prove

Tabella 4. Gruppo di prove per tecniche di gascromatografia non associata alla spettrometria di massa

Tecniche analitiche	Criteri minimi
	Accreditamento di almeno uno dei seguenti metodi**
GC-ECD GC-FID GC-FLD GC* GC-NPD HS-GC (dinamico)* HS-GC* P&T GC* SPME-GC-ECD SPME-GC*	EPA 5030C (tecnica: P&T GC*) APAT/CNR-IRSA 5110 (tecnica: GC-ECD) + metodo/i per i parametri antiparassitari e benzene

* tali tecniche sono associate a metodi che possono indifferentemente applicare un analizzatore di massa o di altra tipologia; in questo caso ci si riferisce al metodo a rivelazione convenzionale

** o altro metodo compreso metodo interno, basato sulla stessa tecnica analitica (vedi Sinossi delle procedure e dei metodi accreditati), in grado di determinare simultaneamente più parametri di cui al gruppo di prove

Tabella 5. Gruppo di prove per tecniche di cromatografia ionica

Tecniche analitiche	Criteri minimi
	Accreditamento di almeno uno dei seguenti metodi*
IC IC-UV-VIS	ISS CBB.037.rev.00 (tecnica: IC)

* o altro metodo compreso metodo interno, basato sulla stessa tecnica analitica (vedi Sinossi delle procedure e dei metodi accreditati), in grado di determinare simultaneamente più parametri di cui al gruppo di prove

Tabella 6. Gruppo di prove per tecniche di spettrometria di massa e di spettrofotometria non associate a tecniche cromatografiche generalmente impiegate per l'analisi di elementi in traccia

Tecniche analitiche	Criteri minimi
	Accreditamento di almeno uno dei seguenti metodi*
AAS CFA CV-AAS CV-AFS ET-AAS F-AAS FIA HG-AAS ICP-idruri ICP-MS ICP-OES	EPA 200.8 (tecnica: ICP-MS) UNI ISO 11885 (tecnica: ICP-OES) EPA 200.9 (tecnica: ET-AAS) + metodo per il parametro boro

* o altro metodo compreso metodo interno, basato sulla stessa tecnica analitica (vedi Sinossi delle procedure e dei metodi accreditati), in grado di determinare simultaneamente più parametri di cui al gruppo di prove.

Tabella 7. Gruppo di prove per tecniche spettrofotometriche, titrimetriche, elettrochimiche, ottiche, chimico-fisiche e organolettiche non associate a tecniche cromatografiche

Tecniche analitiche	Criteri minimi
Accreditamento di almeno uno dei seguenti metodi*	
<i>Calcolo</i>	
<i>Colorimetrico N,N,-DPD</i>	
<i>Conduttometrico</i>	
<i>Gravimetria</i>	
<i>Immunoenzimatico</i>	
<i>Nefelometria</i>	
<i>Organolettico</i>	ISS BHE.019.rev.00 (tecnica: Spettrofot. UV-VIS)
<i>Polarografia</i>	ISS BLA.030.rev.00 (tecnica: torbidimetria)
<i>potenziometria</i>	
<i>Spettr. UV-VIS</i>	
<i>Termometrico</i>	
<i>Titrimetria</i>	
<i>TOC</i>	
<i>torbidimetria</i>	

* o altro metodo compreso metodo interno, basato sulla stessa tecnica analitica (vedi Sinossi delle procedure e dei metodi accreditati), in grado di determinare simultaneamente più parametri di cui al gruppo di prove.

Il laboratorio è tenuto a fornire evidenza dello stato di accreditamento dei metodi analitici che utilizza per le analisi richieste e le tecniche analitiche su cui gli stessi si basano. L'esecuzione dei controlli analitici fini del DL.vo 31/2001 e s.m.i., è infatti subordinata alla verifica – che, una volta raggruppate le analisi in base alle tecniche impiegate per eseguirle, secondo i criteri definiti nelle Tabelle 1-7 – almeno un metodo (e di conseguenza la tecnica analitica associata) per ciascun gruppo così definito sia accreditato UNI CEI EN ISO/IEC 17025 dal laboratorio.

METODI E PROCEDURE IDONEI

Sulla base di quanto introdotto nel capitolo precedente, si riportano specifiche sinossi contenenti liste non esaustive di metodi idonei al controllo dei parametri chimici e indicatori delle acque destinate al consumo umano (Tabelle 1-4). Si precisa che ai fini dell'accreditamento devono essere considerate le ultime versioni dei metodi proposti.

In linea generale sono ritenuti idonei tutti i metodi emessi da enti di normazione (ISO, CEN, UNI, DIN, ecc.) e da altre istituzioni autorevoli quali U.S. EPA, APHA, ecc. e Istituti nazionali e/o internazionali pubblici preposti alla definizione di metodi da utilizzare per le acque destinate al consumo umano, quali APAT/CNR-IRSA, ISS, ecc.

Si sottolinea, inoltre, che è responsabilità del laboratorio dimostrare competenza specifica nell'applicazione dei metodi soddisfacendo le prestazioni minime stabilite dal DM 14 giugno 2017, in accordo a quanto previsto dalla UNI CEI EN ISO/IEC 17025 e dalla normativa vigente. Si possono considerare idonei al controllo delle acque potabili anche metodi tra quelli elencati nelle seguenti Tabelle 1-4 che utilizzino tecniche di analisi migliorative (es. impiego di apparecchiature più performanti) senza snaturare il principio della tecnica e migliorandone le prestazioni.

Tabella 1. Metodi idonei per il controllo analitico delle acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001 per i parametri di cui all'allegato I parte B*

Parametro	Tecnica	Riferimento	Codice
Acrilammide	Calcolo	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS XAA.001.rev.00
	LC-MS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS CBA.001.rev.00
	GC-ECD	U.S. EPA	EPA 8032A
	LC-UV	U.S. EPA	EPA 8316
Antimonio	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS DAA.002.rev.00
	ICP-idruri	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS DBB.034.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020
	ET-AAS	APAT/CNR-IRSA	3060A
	ICP-OES	ISO	ISO 11885
	ICP-MS	ISO	ISO 17294-1
	ICP-MS	ISO	ISO 17294-2
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA 200.15
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA 200.7
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA 200.8
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA 200.9
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA 6010D
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA 6020B
Arsenico	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS DAA.003.rev.00
	ICP-idruri	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS DBB.034.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020
	HG-AAS	APAT/CNR-IRSA	3080A
	SpF UV-VIS	APHA Standard Methods	3500-As C
	ET-AAS	APHA Standard Methods	3113
	ICP-MS	ISO	ISO 17294-1
	ICP-OES	ISO	ISO 11885
	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS DAA.003.rev.00
	ICP-idruri	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS DBB.034.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020
	HG-AAS	APAT/CNR-IRSA	3080A
	SpF UV-VIS	APHA Standard Methods	3500-As C

Parametro	Tecnica	Riferimento	Codice	
Arsenico (continua)	ET-AAS	APHA Standard Methods	3113	
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-1
	ICP-OES	ISO	ISO	11885
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-2
	HG-AAS	ISO	ISO	17378-2
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.15
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	200.8
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	200.9
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	7010
Benzene	HS-GC (statico) - MS	Rapporti ISTISAN 19/07	ISS	CAA.004.rev.01
	HS-GC (dinamico)	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	CAD.004.rev.00
	GC-FID; GC-FLD	APAT/CNR-IRSA	5140	
	P&T GC-MS	APHA Standard Methods	6200B	
	HS-GC	ISO	ISO	11423-1
	GC	ISO	ISO	15680
	HS-SPME-GC-MS	ISO	ISO	17943
	SPME-GC	UNI	UNI	10899
	HS-GC	U.S. EPA	EPA	5021A
	P&T GC	U.S. EPA	EPA	5030C
	GC-MS	U.S. EPA	EPA	524.2
	GC-MS	U.S. EPA	EPA	525.2
Benzo(a)pirene	GC-MS	Rapporti ISTISAN 19/07	ISS	CAB.039.rev.01
	HRGC-LRMS; LC-FLD; LC-UV	APAT/CNR-IRSA	5080	
	LC-FLD	ISO	ISO	17993
	GC-MS	ISO	ISO	28540
	HS-SPME-GC-MS	U.S. EPA	EPA	8272
	Boro	SpF (Curcumina)	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS
SpF (Azometina-H)		Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	BHB.005.rev.00
ICP-OES		Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DBA.035.rev.00
ICP-OES		APAT/CNR-IRSA	3020	
SpF UV-VIS		APAT/CNR-IRSA	3110A1	
ICP-MS		ISO	ISO	17294-1
ICP-OES		ISO	ISO	11885
ICP-MS		ISO	ISO	17294-2
ICP-OES		U.S. EPA	EPA	200.7
ICP-MS		U.S. EPA	EPA	200.8
Bromato	IC	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	CBB.006.rev.00
	IC	ISO	ISO	15061
	IC	U.S. EPA	EPA	300.1B
Cadmio	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DAA.007.rev.00
	ICP-OES	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DBA.035.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020	
	ET-AAS	APAT/CNR-IRSA	3120B	
	ET-AAS	APHA Standard Methods	3113	
	ICP-OES	ISO	ISO	11885
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-1
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-2
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.15
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7
ICP-MS	U.S. EPA	EPA	200.8	

Parametro	Tecnica	Riferimento	Codice		
Cadmio (continua)	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	200.9	
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D	
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B	
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	7010	
	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DAA.008.rev.00	
	ICP-OES	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DBA.035.rev.00	
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020		
	ET-AAS	APAT/CNR-IRSA	3150B1		
	SpF UV-VIS	APAT/CNR-IRSA	3150C		
	SpF UV-VIS	APHA Standard Methods	3500-Cr B		
Cromo	ICP-MS	ISO	ISO	17294-1	
	ICP-OES	ISO	ISO	11885	
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-2	
	FIA; CFA	ISO	ISO	23913	
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.15	
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7	
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	200.8	
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	200.9	
	IC-UV-VIS	U.S. EPA	EPA	218.7	
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D	
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B	
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	7010	
	Polarografia	U.S. EPA	EPA	7198	
	IC	U.S. EPA	EPA	7199	
	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DAA.009.rev.00	
	ICP-OES	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DBA.035.rev.00	
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020		
	F-AAS	APAT/CNR-IRSA	3250A		
	ET-AAS	APAT/CNR-IRSA	3250B		
	SpF UV-VIS	APAT/CNR-IRSA	3250C		
Rame	ICP-OES	ISO	ISO	11885	
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-1	
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-2	
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.15	
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7	
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	200.8	
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	200.9	
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D	
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B	
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	7010	
	SpF (pirazolone-piridina)	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	BHC.010.rev.00	
	Cianuri totali	Titrimetria; SpF UV-VIS	APAT/CNR-IRSA	4070	
		FIA	ISO	ISO	14403-1
		CFA	ISO	ISO	14403-2
		titrimetria	U.S. EPA	EPA	9010C
HS-GC		Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	CAA.036.rev.00	
1,2 dicloroetano	GC-ECD	APAT/CNR-IRSA	5150		
	P&T GC-MS	APHA Standard Methods	6200B		
	HS-SPME-GC-MS	ISO	ISO	17943	
	SPME-GC	UNI	UNI	10899	
	HS-GC	U.S. EPA	EPA	5021A	
	P&T GC	U.S. EPA	EPA	5030C	

Parametro	Tecnica	Riferimento	Codice	
Epicloridrina	Calcolo	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	XAA.011.rev.00
	SPME-GC-ECD; SPME-GC-MS	UNI	UNI-EN	14207
	HS-GC	U.S. EPA	EPA	5021A
	P&T GC	U.S. EPA	EPA	5030C
Fluoruro	IC	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	CBB.037.rev.00
	IC	APAT/CNR-IRSA	4020	
	IC	ISO	ISO	10304-1
	IC	U.S. EPA	EPA	300.1
Piombo	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DAA.012.rev.00
	ICP-OES	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DBA.035.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020	
	ET-AAS	APAT/CNR-IRSA	3230B	
	ET-AAS	APHA Standard Methods	3113	
	ICP-OES	ISO	ISO	11885
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-1
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-2
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.15
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	200.8
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	200.9
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B
ET-AAS	U.S. EPA	EPA	7010	
Mercurio	CV-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DAB.013.rev.00
	CV-AAS	APAT/CNR-IRSA	3200A1	
	CV-AAS	APAT/CNR-IRSA	3200A2	
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-1
	ICP-OES	ISO	ISO	11885
	AAS	ISO	ISO	12846
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-2
	CV-AAS	U.S. EPA	EPA	1631E
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	200.8
	CV-AFS	U.S. EPA	EPA	245.7
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B
	AAS	U.S. EPA	EPA	7473
Nichel	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DAA.014.rev.00
	ICP-OES	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DBA.035.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020	
	ET-AAS	APAT/CNR-IRSA	3220B	
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-1
	ICP-OES	ISO	ISO	11885
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-2
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.15
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	200.8
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	200.9
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	7010

Parametro	Tecnica	Riferimento	Codice	
Nitrato (come NO₃)	IC	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	CBB.037.rev.00
	IC	APAT/CNR-IRSA	4020	
	SpF UV-VIS	APHA Standard Methods	4500NO3 B	
	IC	ISO	ISO	10304-1
	IC	U.S. EPA	EPA	300.1
Nitrito (come NO₂)	IC	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	CBB.037.rev.00
	IC	APAT/CNR-IRSA	4020	
	SpF UV-VIS	APAT/CNR-IRSA	4050	
	SpF UV-VIS	APHA Standard Methods	4500NO2 B	
	IC	ISO	ISO	10304-1
Antiparassitari	IC	U.S. EPA	EPA	300.1
	GC/LC-MS; GC/LC-MSMS; GC/LC- HRMS**	Rapporti ISTISAN 19/07	ISS	CAC.015.rev.01
	GC-NPD; LC-UV; GC-MS	APAT/CNR-IRSA	5060	
	SPME-GC-MS	ISO	ISO	27108
	GC-MS	U.S. EPA	EPA	525.2
Glifosato, AMPA e glufosinato	LC-MS	U.S. EPA	EPA	536
	LC-HRMS**; LC-MSMS	Rapporti ISTISAN 19/07	ISS	CBA.049.rev00
	UPLC™-MSMS	Rapporti ISTISAN 19/07	ISS	CBA.050.rev00
	IC-HRMS**	Rapporti ISTISAN 19/07	ISS	CBC.001.rev00
	LC-MSMS	ISO	ISO	16308
Idrocarburi policiclici aromatici	GC-MS	Rapporti ISTISAN 19/07	ISS	CAB.039.rev.01
	GC-LRMS; LC-FLD; LC-UV	APAT/CNR-IRSA	5080	
	LC-FLD	ISO	ISO	17993
	GC-MS	ISO	ISO	28540
	GC-MS	U.S. EPA	EPA	525.2
Selenio	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DAA.016.rev.00
	ICP-idruri	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DBB.034.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020	
	ET-AAS	APHA Standard Methods	3113	
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-1
	ICP-OES	ISO	ISO	11885
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-2
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.15
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	200.8
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	200.9
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	270.2
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D
ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B	
Tetracloro- etilene	HS-GC	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	CAA.036.rev.00
	GC-ECD	APAT/CNR-IRSA	5150	
	P&T GC-MS	APHA Standard Methods	6200B	
	GC-ECD	ISO	ISO	10301
	SPME-GC	UNI	UNI	10899
	HS-GC	U.S. EPA	EPA	5021A
	P&T GC	U.S. EPA	EPA	5030C
	GC-MS	U.S. EPA	EPA	524.2
	GC-ECD	U.S. EPA	EPA	551.1

Parametro	Tecnica	Riferimento	Codice	
Tricloro-etilene	HS-GC	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	CAA.036.rev.00
	GC-ECD	APAT/CNR-IRSA	5150	
	P&T GC-MS	APHA Standard Methods	6200B	
	GC-ECD	ISO	ISO	10301
	GC	ISO	ISO	15680
	SPME-GC	UNI	UNI	10899
	HS-GC	U.S. EPA	EPA	5021A
	P&T GC	U.S. EPA	EPA	5030C
	GC-MS	U.S. EPA	EPA	524.2
	GC-ECD	U.S. EPA	EPA	551.1
Triometani totali	HS-GC	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	CAA.036.rev.00
	GC-ECD	APAT/CNR-IRSA	5150	
	GC	ISO	ISO	15680
	SPME-GC	UNI	UNI	10899
	HS-GC	U.S. EPA	EPA	5021A
	P&T GC	U.S. EPA	EPA	5030C
Cloruro di Vinile	GC-MS	U.S. EPA	EPA	524.2
	Calcolo	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	XAA.040.rev.00
	GC-ECD	APAT/CNR-IRSA	5150	
	P&T GC-MS	APHA Standard Methods	6200B	
	HS-GC	ISO	ISO	11423-1
	GC-ECD	ISO	ISO	10301
	GC	ISO	ISO	15680
	SPME-GC	UNI	UNI	10899
	HS-GC	U.S. EPA	EPA	5021A
	P&T GC	U.S. EPA	EPA	5030C
Clorito	GC-MS	U.S. EPA	EPA	524.2
	IC	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	CBB.037.rev.00
	IC	U.S. EPA	EPA	300.1
Vanadio	IC	ISO	ISO	10304-1
	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DAA.017.rev.00
	ICP-OES	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DBA.035.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020	
	ET-AAS	APAT/CNR-IRSA	3310A	
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-1
	ICP-OES	ISO	ISO	11885
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-2
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.15
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	200.8
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	200.9
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B
ET-AAS	U.S. EPA	EPA	7010	

* Sono da considerare idonei per il controllo analitico delle acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001 metodi interni previa dimostrazione dell'ottenimento di prestazioni accettabili per gli analiti alle concentrazioni di interesse, secondo le disposizioni normative vigenti

** L'analizzatore a spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) deve garantire nell'analisi quantitativa una risoluzione $R \geq 15.000$ a 200 u.m.a.

Tabella 2. Metodi idonei per il controllo analitico delle acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001 per i parametri di cui all'allegato I parte C*

Parametro	Tecnica	Riferimento	Codice	
Alluminio	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DAA.018.rev.00
	ICP-OES	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DBA.035.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020	
	ET-AAS	APAT/CNR-IRSA	3050B	
	SpF UV-VIS	APAT/CNR-IRSA	3050C	
	ICP-OES	ISO	ISO	11885
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-1
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-2
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.15
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	200.8
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	200.9
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B
ET-AAS	U.S. EPA	EPA	7010	
Ammonio	SpF (indofenolo)	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	BHE.019.rev.00
	IC	APAT/CNR-IRSA	3030	
	SpF UV-VIS	APAT/CNR-IRSA	4030A1	
	SpF UV-VIS	APAT/CNR-IRSA	4030A2	
	SpF UV-VIS	APAT/CNR-IRSA	4030C	
	SpF UV-VIS	APHA Standard Methods	4500NH3 F	
	FIA; CFA	ISO	ISO	11732
	IC	ISO	ISO	14911
	SpF UV-VIS	ISO	ISO	7150-1
SpF UV-VIS	UNI	UNI	11669A	
Cloruro	Tit. argentometrica	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	BEA.020.rev.00
	IC	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	CBB.037.rev.00
	IC	APAT/CNR-IRSA	4020	
	titrimetria	APAT/CNR-IRSA	4090A1	
	IC	ISO	ISO	10304-1
	IC	U.S. EPA	EPA	300.1
Colore	Organolettica	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	BJA.021.rev.00
	Organolettica	APAT/CNR-IRSA	2020	
Conduktivita elettrica	Conduttometrico	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	BDA.022.rev.00
	Conduttometrico	APAT/CNR-IRSA	2030	
pH	potenziometria	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	BCA.023.rev.00
	potenziometria	APAT/CNR-IRSA	2060	
	potenziometria	APHA Standard Methods	4500-H	
	potenziometria	ISO	ISO	10523
	potenziometria	U.S. EPA	EPA	150.1
Ferro	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DAA.024.rev.00
	ICP-OES	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DBA.035.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020	
	F-AAS	APAT/CNR-IRSA	3160A	
	ET-AAS	APAT/CNR-IRSA	3160B	
	SpF UV-VIS	APHA Standard Methods	3500-Fe D	
	ICP-OES	ISO	ISO	11885
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-1
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-2
	SpF UV-VIS	ISO	ISO	6332
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.15
ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7	

Parametro	Tecnica	Riferimento	Codice
Ferro (continua)	ICP-MS	U.S. EPA	EPA 200.8
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA 200.9
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA 6010D
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA 6020B
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA 7010
Manganese	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS DAA.025.rev.00
	ICP-OES	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS DBA.035.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020
	ET-AAS	APAT/CNR-IRSA	3190B
	SpF UV-VIS	APHA Standard Methods	3500-Mn D
	ICP-OES	ISO	ISO 11885
	ICP-MS	ISO	ISO 17294-1
	ICP-MS	ISO	ISO 17294-2
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA 200.15
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA 200.7
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA 200.8
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA 200.9
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA 6010D
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA 6020B
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA 7010
Odore	Organolettico	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS BAA.026.rev.00
	Organolettico	APAT/CNR-IRSA	2050
	Organolettico	UNI	UNI-EN 1622
Ossidabilità	titrimetria	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS BEB.027.rev.00
	titrimetria	ISO	ISO 8467
TOC		Rapporti ISTISAN 07/31	ISS BIA.029.rev.00
		APAT/CNR-IRSA	5040
		APHA Standard Methods	5310A
		ISO	ISO 8245
		UNI	UNI-EN 1484
Disinfettante residuo	Colorim. N,N,-DPD	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS BHD.033.rev.00
	Colorim. N,N,-DPD	APAT/CNR-IRSA	4080
Durezza	Titrimetrico EDTA	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS BEC.031.rev.00
	Calcolo	APAT/CNR-IRSA	2040A
	titrimetria	APAT/CNR-IRSA	2040B
	Titrimetria	APHA Standard Methods	2340B
	IC	ISO	ISO 14911
Residuo secco 180°C	titrimetria	ISO	ISO 6059
	Gravimetria	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS BFA.032.rev.00
Solfato	Gravimetria	UNI	UNI 10506
	IC	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS CBB.037.rev.00
	IC	APAT/CNR-IRSA	4020
	torbidimetria	APAT/CNR-IRSA	4140B
	IC	ISO	ISO 10304-1
Sodio	IC	U.S. EPA	EPA 300.1
	IC	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS CBB.038.rev.00
	ICP-OES	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS DBA.035.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020
	IC	APAT/CNR-IRSA	3030
	F-AAS	APAT/CNR-IRSA	3270
	IC	ISO	ISO 14911
	ICP-OES	ISO	ISO 11885
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA 200.7
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA 200.8

Parametro	Tecnica	Riferimento	Codice	
Sodio (continua)	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B
Sapore	Organolettica	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	BKA.028.rev.00
	Organolettica	APAT/CNR-IRSA	2080	
	Organolettica	UNI	UNI-EN	1622
Torbidità	NfM (formazina)	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	BLA.030.rev.00
	NfM (formazina)	APAT/CNR-IRSA	2110	
	NfM; turbidimetria	ISO	ISO	7027
	NfM (formazina)	U.S. EPA	EPA	180.1

* Sono da considerare idonei per il controllo analitico delle acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001 metodi interni previa dimostrazione dell'ottenimento di prestazioni accettabili per gli analiti alle concentrazioni di interesse, secondo le disposizioni normative vigenti

Tabella 3. Metodi idonei per il controllo analitico delle acque destinate al consumo umano per parametri non espressamente inclusi tra i controlli del DL.vo 31/2001*

Parametro	Tecnica	Riferimento	Codice	
Calcio	Titrimetrico EDTA	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	BEC.041.rev.00
	IC	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	CBB.038.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020	
	IC	APAT/CNR-IRSA	3030	
	F-AAS	APAT/CNR-IRSA	3130A	
	IC	ISO	ISO	14911
	ICP-OES	ISO	ISO	11885
	AAS	ISO	ISO	7980
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	200.8
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B
	Solidi Indisciolti	Gravimetria	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS
Gravimetria		APAT/CNR-IRSA	2090B	
Temperatura	Termometrico	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	BBA.044.rev.00
	Termometrico	APAT/CNR-IRSA	2100	
	Termometrico	UNI	UNI	10500
Cianotossine (microcistine)	Immunoenzimatico	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	BGA.046.rev.00
	LC-MS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	CBA.044.rev.00
	LC-MSMS	Rapporti ISTISAN 19/07	ISS	CBA.053.rev.00
Policlorobifenili (PCB)	AUTO-SPME-HS	Rapporti ISTISAN 19/07	ISS	CAA.037.rev.00
	GC-MSMS			
	GC-ECD; GC-MS	APAT/CNR-IRSA	5110	
	GC-HRMS**	U.S. EPA	EPA	1668C
	GC-HRMS**	U.S. EPA	EPA	1668B
Composti Perfluoroalchilici (PFAS)	LC-HRMS**	Rapporti ISTISAN 19/07	ISS	CBA.051.rev.00
	LC-MSMS	Rapporti ISTISAN 19/07	ISS	CBA.052.rev.00
	LC-MSMS	U.S. EPA	EPA	537
	LC-MSMS	ISO	ISO	25101
Argento	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DAA.045.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020	
	ET-AAS	APAT/CNR-IRSA	3070A	
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-1
	ICP-OES	ISO	ISO	11885
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-2
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	200.8
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B

Parametro	Tecnica	Riferimento	Codice	
Bario	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DAA.046.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020	
	ET-AAS	APAT/CNR-IRSA	3090B	
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-1
	ICP-OES	ISO	ISO	11885
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-2
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.15
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	200.8
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	7010
	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DAA.048.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020	
ET-AAS	APAT/CNR-IRSA	3140A		
Cobalto	ICP-MS	ISO	ISO	17294-1
	ICP-OES	ISO	ISO	11885
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-2
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.15
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	200.8
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	7010
	ET-AAS	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	DAA.049.rev.00
	ICP-OES	APAT/CNR-IRSA	3020	
	F-AAS	APAT/CNR-IRSA	3320A	
	ICP-MS	ISO	ISO	17294-1
	ICP-OES	ISO	ISO	11885
Zinco	ICP-MS	ISO	ISO	17294-2
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.15
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	200.7
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	200.8
	ICP-OES	U.S. EPA	EPA	6010D
	ICP-MS	U.S. EPA	EPA	6020B
	ET-AAS	U.S. EPA	EPA	7010

* Sono da considerare idonei per il controllo analitico delle acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001 metodi interni previa dimostrazione dell'ottenimento di prestazioni accettabili per gli analiti alle concentrazioni di interesse, secondo le disposizioni normative vigenti

** L'analizzatore a spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) deve garantire nell'analisi quantitativa una risoluzione $R \geq 15.000$ a 200 u.m.a.

Tabella 4. Procedure correlate al controllo analitico delle acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001

Oggetto	Tecnica	Riferimento	Codice	
Prelievo e conservazione dei campioni	-	Rapporti ISTISAN 07/31	ISS	PGA.901.rev.00
	-	APAT/CNR-IRSA	1030	
	-	ISO	ISO	5667-5
Pretrattamento del campione	Mineralizzazione	APAT/CNR-IRSA	3010A	
	Mineralizzazione a MW	APAT/CNR-IRSA	3010B	
	Mineralizzazione	ISO	ISO	15587-1
	Mineralizzazione a MW	ISO	ISO	15587-2
	Mineralizzazione	U.S. EPA	EPA	3005A
	Mineralizzazione a MW	U.S. EPA	EPA	3015A
	Estr. Liquido-Liquido	U.S. EPA	EPA	3510C
	SPE	U.S. EPA	EPA	3535A

PARTE A
Sintesi dei metodi ISS idonei al soddisfacimento
dei requisiti di cui al DL.vo 31/2001

Acrilammide: metodo ISS.CBA.001.rev.00

Metodo* in LC-MS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	R %	Rif.*	CV %	Rif.*	%	Rif.**
Acrilammide 0,10	0,02	-	0,03	0,03 (30%)	90	-	15	-	25	-

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Alluminio: metodo ISS.DAA.018.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Alluminio 200	5	20 (10%)	6	60 (30%)	10	10	10	10	25	25

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Alluminio, boro, cadmio, cromo, ferro, manganese, nichel, piombo, rame, sodio, vanadio: metodo ISS.DBA.035.rev.00

Metodo* in ICP-OES

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD***		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Alluminio 200	0,8	20 (10%)	-	60 (30%)	10	10	10	10	20	25
Cadmio 5,0	0,1	0,5 (10%)	-	1,5 (30%)	10	10	10	10	20	25
Cromo totale 50	0,2	5 (10%)	-	15 (30%)	10	10	10	10	20	30

Ferro	200	0,3	20 (10%)	-	60 (30%)	10	10	10	10	20	30
Manganese	50	0,1	5 (10%)	-	15 (30%)	10	10	10	10	20	30
Nichel	20	0,4	2 (10%)	-	6 (30%)	10	10	10	10	20	25
Piombo	10	0,5	1 (10%)	-	3 (30%)	10	10	10	10	20	25
Vanadio	140	0,5	-	-	-	10	-	10	-	20	-

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

*** determinato con nebulizzatore a ultrasuoni

Valore (mg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)										
	LOD***		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza		
	mg/L	Rif.*	mg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**	
Boro	1,0	0,005****	0,1 (10%)	-	0,3 (30%)	10	10	10	10	20	25
Rame	1,0	0,0003	0,1 (10%)	-	0,3 (30%)	10	10	10	10	20	25
Sodio	200	0,1****	20 (10%)	-	60 (30%)	5	10	5	10	10	15

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

*** determinato con nebulizzatore a ultrasuoni

**** determinato con nebulizzatore pneumatico

Ammonio: metodo ISS.BHE.019.rev.00

Metodo* spettrofotometrico al salicilato-ipoclorito (indofenolo)

Valore (mg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)										
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza		
	mg/L	Rif.*	mg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**	
Ammonio	0,50	0,05	0,05 (10%)	0,15	0,15 (30%)	10	10	10	10	15	40

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Antimonio: metodo ISS.DAA.002.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Antimonio 5,0	1	1,25 (25%)	1,5	1,5 (30%)	25	25	25	25	25	40

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Antiparassitari: metodo ISS.CAC.015.rev.01

Metodo* SPE-GC (PARTE A) e metodo UHPLC (PARTE B) con rivelatori selettivi

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Antiparassitari 0,01			0,01	0,025	≤25	25	≤20	25	30-80	30 -80
Antiparassitari 0,1			0,01	0,025	≤25	25	≤ 20	25	30-80	30 -80

* DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Nota: con la voce antiparassitari si fa riferimento genericamente alle sostanze di cui gli allegati 7, 8, 9 e 10

Argento: metodo ISS.DAA.045.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Argento -	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Arsenico, antimonio e selenio: metodo ISS.DBB.034.rev.00

Metodo* in ICP-OES (idruri)

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Antimonio 5,0	1,25	1,25 (25%)	-	1,5 (30%)	25	25	25	25	20	40
Arsenico 10	1	1 (10%)	-	3 (30%)	10	10	10	10	20	30
Selenio 10	1	1 (10%)	-	3 (30%)	10	10	10	10	32	40

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Arsenico: metodo ISS.DAA.003.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Arsenico 10	1	1 (10%)	3	3 (30%)	10	10	10	10	25	30

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Bario: metodo ISS.DAA.046.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.* %	%	Rif.* %	%	Rif.**
Bario -	1	-	-	-	10	-	10	-	-	-

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Benzene e altri VOC: metodi ISS.CAA.004.rev.01 e ISS.CAD.004.rev.00

Metodo* in HS-SPME-GC-MS E HS-GC-MS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD***		LOQ****		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	R%	Rif.*	CV%	Rif.*	U%	Rif.**
Benzene										
1,0*****	0,03	0,25 (25%)	0,1	0,3 (30%)		75-125		25		40
0,560					96		8		27	
0,662					95		7		12	
0,918					92		8		12	
Toluene										
	0,05		0,1							
0,820					105		13		42	
1,48					100		11		38	
1,96					99		3		27	
Etil-benzene										
	0,08		0,1							
0,57					100		22		22	
1,15					99		9		30	
1,62					106		10		34	
Stirene										
1,08					104		8		16	
1,25					95		7		11	
1,70					100		6		-	
m+p-Xilene										
	0,06		0,1							
3,07					107		13		34	
1,26					102		11		39	
1,50					110		14		17	
o-Xilene										
	0,06		0,1							
1,18					102		5		16	
1,15					97		5		8	
1,26					107		8		9	

* DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

*** valore ottenuto dal calcolo dallo scarto tipo dei residui ricavato dall'elaborazione statistica della retta di taratura su 7 punti, in un intervallo di concentrazione compreso tra 0,05-5,0 µg/L

**** valore ottenuto da prove di ripetibilità effettuate da un singolo laboratorio mediante aggiunta di standard certificato ad un campione bianco alla concentrazione di 0,1 µg/L

***** valore di parametro normativo

Benzo(a)pirene e IPA: metodo ISS.CAB.039.rev.01

Metodo* in GC-MS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	R%	Rif.*	CV%	Rif.*	U%	Rif.**
Benzo(a)Pirene										
0,010	0,001	0,0025 (25%)	0,003	0,003 (30%)	-	75-125	-	25	-	50
0,0025	-	-	-	-	100	-	9	-	44	-
0,010	-	-	-	-	99	-	5	-	44	-
0,025	-	-	-	-	99	-	4	-	44	-
Benzo(b)fluorantene										
0,10	0,001	0,025 (25%)	0,003 ***	0,03 (30%)	-	75-125	-	25	-	50
0,0025	-	-	-	-	108	-	6	-	44	-
0,010	-	-	-	-	97	-	5	-	44	-
0,025	-	-	-	-	92	-	3	-	44	-
Benzo(k)fluorantene										
0,10	0,001	0,025 (25%)	0,003 ***	0,03 (30%)	-	75-125	-	25	-	50
0,0025	-	-	-	-	103	-	6	-	44	-
0,010	-	-	-	-	100	-	5	-	44	-
0,025	-	-	-	-	98	-	5	-	44	-
Benzo(ghi)perilene										
0,10	0,001	0,025 (25%)	0,003 ***	0,03 (30%)	-	75-125	-	25	-	50
0,0025	-	-	-	-	100	-	9	-	44	-
0,010	-	-	-	-	100	-	5	-	44	-
0,025	-	-	-	-	98	-	6	-	44	-
Indeno(1,2,3-cd)pirene										
0,10	0,001	0,025 (25%)	0,003 ***	0,03 (30%)	-	75-125	-	25	-	50
0,0025	-	-	-	-	105	-	10	-	44	-
0,010	-	-	-	-	99	-	5	-	44	-
0,025	-	-	-	-	97	-	7	-	44	-

* DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

*** come somma di (Benzo(b)fluorantene, Benzo(k)fluorantene, Benzo(ghi)perilene, Indeno(1,2,3-cd)pirene) alla concentrazione di 0,01 µg/L

Boro: metodo ISS.BHA.005.rev.00

Metodo* spettrofotometrico alla curcumina

Valore (mg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	mg/L	Rif.*	mg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Boro										
1,0	0,1	0,1 (10%)	-	0,3 (30%)	10	10	10	10	-	25

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

Boro: metodo ISS.BHB.005.rev.00

Metodo* spettrofotometrico all'azometina H

Valore (mg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	mg/L	Rif.*	mg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Boro 1,0	0,1	0,1 (10%)	0,3	0,3 (30%)	10	10	10	10	20	25

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Bromato: metodo ISS.CBB.006.rev.00

Metodo* in IC

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Bromato 10	1	2,5 (25%)	3	3 (30%)	25	25	25	25	30	40

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

**Bromuro, clorito, cloruro, fluoruro, fosfato, ioduro, nitrato, nitrito, solfato:
metodo ISS.CBB.037.rev.00**

Metodo* in IC

Valore (mg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	mg/L	Rif.*	mg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Bromuro -	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluoruro 1,5	0,1	0,15 (10%)	0,45	0,45 (30%)	10	10	10	10	20	20
Fosfato -	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ioduro -	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato (come NO₃) 50	0,5	5 (10%)	15	15 (30%)	10	10	10	10	10	15
Nitrito (come NO₂) 0,5	0,01	0,05 (10%)	0,15	0,15 (30%)	10	10	10	10	15	20

Valore (mg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)										
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza		
	mg/L	Rif.*	mg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**	
Cloruro											
250	0,5	25 (10%)	75	75 (30%)	10	10	10	10	10	15	
Solfato											
250	0,5	25 (10%)	75	75 (30%)	10	10	10	10	10	15	

* DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)										
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza		
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**	
Clorito											
700	200	-	-	-	10	-	10	-	10	-	

* DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

Cadmio: metodo ISS.DAA.007.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)										
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza		
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**	
Cadmio											
5,0	0,1	0,5 (10%)	0,5	1,5 (30%)	10	10	10	10	25	25	

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

Calcio: metodo ISS.BEC.041.rev.00

Metodo* titrimetrico all'EDTA

Valore (mg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)										
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza		
	mg/L	Rif.*	%	Rif.** %	%	Rif.* %	%	Rif.* %	%	Rif.** %	
Calcio											
40***	1	-	-	-	10	-	10	-	-	-	

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017 ***valore stimato

Calcio, litio, magnesio, potassio, sodio: metodo ISS.CBB.038.rev.00

Metodo* in IC

Valore (mg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	mg/L	Rif.*	mg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Calcio	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Litio	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Magnesio	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Potassio	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Sodio 200	0,5	20 (10%)	-	60 (30%)	10	10	10	10	10	15

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Carbonio organico totale: metodo ISS.BIA.029.rev.00

Metodo* per analizzatore di carbonio organico totale

Valore (mg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	mg/L	Rif.*	mg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Carbonio org.tot. Nessuna variazione anomala	-	-	0,1	-	10	-	10	-	25	30 ***

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

***stimata a 3 mg/L

Cianuri totali: metodo ISS.BHC.010.rev.00

Metodo* spettrofotometrico con pirazolone-piridina

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Cianuri totali 50	5	5 (10%)	-	15 (30%)	10	10	10	10	25	30

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Cloro libero e cloro totale: metodo ISS.BHD.033.rev.00

Metodo* colorimetrico alla N,N-dietil-p-fenilendiammina

Valore (mg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	mg/L	Rif.*	mg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Disinfettante residuo 0,2***	0,05	-	-	-	25	-	12	-	-	-

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017 *** valore consigliato

Cloruro: metodo ISS.BEA.020.rev.00

Metodo* titrimetrico argentometrico secondo Mohr

Valore (mg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	mg/L	Rif.*	mg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Cloruro 250	5	25 (10%)	-	75 (30%)	10	10	10	10	10	15

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

Cobalto: metodo ISS.DAA.048.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Cobalto -	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

Composti organoalogenati volatili: metodo ISS.CAA.036.rev.00

Metodo* in HS-GC (estratto pentanico)

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
1,2 dicloroetano										
3,0	0,3	0,3 (10%)	-	0,9 (30%)	0,7	25	0,7	25	25	40
Tetracloroetilene										
10***	0,1	1 (10%)	-	3 (30%)	1,2	25	1,2	25	25	30
Tricloroetilene										
10****	0,1	1 (10%)	-	3 (30%)	1,2	25	1,2	25	25	40
Triometani-Tot*****										
30	3	3 (10%)	-	9 (30%)	1,8	25	1,8	25	25	40
Bromoformio										
-	0,5	-	-	-	1,8	-	1,8	-	-	-

* DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019; ** DM 14 giugno 2017; *** somma con tricloetilene; **** somma con tetracloroetilene
***** sono considerate le sostanze: cloroformio, clorodibromometano e diclorobromometano

Composti perfluoroalchilici: metodo ISS.CBA.051.rev.00

Metodo* in LC-HRMS (iniezione diretta)

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ**		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.***	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.***
PFOS	-	-	0,003	-	≤25	-	≤20	-	≤50	-
PFOA	-	-	0,01	-	≤25	-	≤20	-	≤50	-
PFBA	-	-	0,01	-	≤25	-	≤20	-	≤50	-
PFBS	-	-	0,01	-	≤25	-	≤20	-	≤50	-
PFPeA	-	-	0,01	-	≤25	-	≤20	-	≤50	-
PFHxA	-	-	0,01	-	≤25	-	≤20	-	≤50	-
Altri PFAS****	-	-	0,01	-	≤25	-	≤20	-	≤50	-

* DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** non si esclude la possibilità di raggiungere LOQ più performanti anche per effetto dell'evoluzione tecnologica *** DM 14 giugno 2017 **** PFHxS, PFHpA, PFNA, PFDeA, PFUnA e PFDoA

Metodo* LC-HRMS (SPE on-line)

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ**		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.***	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.***
PFOS	-	-	0,0002	-	≤25	-	≤ 20	-	≤50	-
PFOA	-	-	0,005	-	≤25	-	≤ 20	-	≤50	-
PFBA	-	-	0,005	-	≤25	-	≤ 20	-	≤50	-
PFBS	-	-	0,001	-	≤25	-	≤ 20	-	≤50	-
PFPeA	-	-	0,005	-	≤25	-	≤ 20	-	≤50	-
PFHxA	-	-	0,005	-	≤25	-	≤ 20	-	≤50	-
Altri PFAS****	-	-	0,005	-	≤25	-	≤ 20	-	≤50	-

* DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019
effetto dell'evoluzione tecnologica

** non si esclude la possibilità di raggiungere LOQ più performanti anche per
*** DM 14 giugno 2017 **** PFHxS, PFHpA, PFNA, PFDeA,PFUnA e PFDoA

Composti perfluoroalchilici: metodo ISS.CBA.052.rev.00

Metodo* in LC-MSMS (iniezione diretta)

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
PFOS	-	-	0,005	-	70-130	-	20	-	44	-
PFOA	-	-	0,005	-	70-130	-	20	-	44	-
PFBA	-	-	0,005	-	70-130	-	20	-	44	-
PFBS	-	-	0,005	-	70-130	-	20	-	44	-
PFPeA	-	-	0,005	-	70-130	-	20	-	44	-
PFHxA	-	-	0,005	-	70-130	-	20	-	44	-
Altri PFAS***	-	-	0,005	-	70-130	-	20	-	44	-

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

*** PFHpA,PFNA,PFDA,PFUnDA.PFDoDA,PFHxS,4:2 FTS,6:2 FTS e 8:2 FTS (esclusi PFHpS, HFPO-DA, cC6O4)

Metodo* LC-MSMS (SPE on-line)

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
PFOS	-	-	0,0002	-	70-130	-	30	-	44	-
PFOA	-	-	0,005	-	70-130	-	20	-	44	-
PFBA	-	-	0,005	-	70-130	-	20	-	44	-
PFBS	-	-	0,005	-	70-130	-	20	-	44	-
PFPeA	-	-	0,005	-	70-130	-	20	-	44	-
PFHxA	-	-	0,005	-	70-130	-	20	-	44	-
Altri PFAS***	-	-	0,005	-	70-130	-	20	-	44	-

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

*** PFHpA,PFNA,PFDA,PFUnDA,PFDoDA,PFHxS,4:2 FTS,6:2 FTS e 8:2 FTS (esclusi PFHpS, HFPO-DA, cC6O4)

Conducibilità elettrica: metodo ISS.BDA.022.rev.00

Metodo* conduttometrico

Valore (µS/cm 20°C)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µS/cm 20°C	Rif.*	µS/cm 20°C	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Conducibilità elettrica 2500	5	250 (10%)	-	750 (30%)	5	10	5	10	20	20

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

Cromo: metodo ISS.DAA.008.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Cromo tot 50	2	5 (10%)	-	15 (30%)	10	10	10	10	25	30

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

Durezza totale: metodo ISS.BEC.031.rev.00

Metodo* titrimetrico all'EDTA

Valore (°f)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	°f	Rif.*	°f	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	°f	Rif.**
Durezza 15-50 ***	0,5	-	-	-	10****	-	15****	-	-	-

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

***valori consigliati

****stimata a 10 °f

Ferro: metodo ISS.DAA.024.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Ferro 200	1	20 (10%)	3	60 (30%)	10	10	10	10	25	30

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Glifosato, glufosinato e AMPA in acqua destinata al consumo umano: metodo ISS.CBA.049.rev.00

Metodo* in LC-HRMS (derivatizzazione con FMOC-Cl) o LC-MSMS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Glifosato 0,10	-	-	0,02	0,0025	15	25	19	25	25	30-80
Glufosinato 0,10	-	-	0,02	0,0025	10	25	≤20	25	34	30-80
AMPA 0,10	-	-	0,02	0,0025	2	25	18	25	34	30-80

* DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Glifosato, glufosinato e AMPA in acqua destinata al consumo umano, superficiale e sotterranea: metodo ISS.CBC.001.rev.00

Metodo* in IC-HRMS (iniezione diretta)

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ**		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.***	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.***
Glifosato ****	-	-	0,025	0,025	2,2	25	5,1	≤ 20	17	30-80
Glufosinato ****	-	-	0,025	0,025	7,2	25	4,1	≤ 20	17	30-80
AMPA ****	-	-	0,025	0,025	3,9	25	13,6	≤ 20	10	30-80
Glifosato *****	-	-	0,025	0,025	7,9	25	6,1	≤ 20	15	30-80
Glufosinato *****	-	-	0,025	0,025	4,6	25	5,2	≤ 20	13	30-80
AMPA *****	-	-	0,025	0,025	5,3	25	6,4	≤ 20	12	30-80

* DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** non si esclude la possibilità di raggiungere LOQ più performanti anche per effetto dell'evoluzione tecnologica *** DM 14 giugno 2017 **** Concentrazione teorica 0,03 µg/L, quale approssimazione per eccesso del valore di specifica pari a 0,025 (vedi punto 2.2, nota 6 del DL.vo 31/2001) ***** Concentrazione teorica 0,10 µg/L

Glifosato e AMPA in acqua destinata al consumo umano: metodo ISS.CBA.050.rev.00

Metodo* in UPLC™-MSMS (derivattizzazione pre-colonna con AccQ-Tag)

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Glifosato 0,01	-	-	0,01	0,025	5,6	25	6,9	≤ 20	10	30-80
AMPA 0,01	-	-	0,01	0,025	4,3	25	7,2	≤ 20	10	30-80
Glufosinato 0,01	-	-	0,01	0,025	3,0	25	2,9	≤ 20	5	30-80
Glifosato 0,10	-	-	0,01	0,025	3,7	25	7,6	≤ 20	10	30-80
AMPA 0,10	-	-	0,01	0,025	0,8	25	4,3	≤ 20	5	30-80
Glufosinato 0,10	-	-	0,01	0,025	1,8	25	1,8	≤ 20	5	30-80

* DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

Manganese: metodo ISS.DAA.025.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Manganese 50	0,5	5 (10%)	1,5	15 (30%)	10	10	10	10	30	30

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Mercurio: metodo ISS.DAB.013.rev.00

Metodo* in CV-ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Mercurio 1,0	0,2	0,2 (20%)	0,3	0,3 (30%)	10	20	10	10	15	30

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Microcistine: metodo ISS.BGA.044.rev.00

Metodo* immunoenzimatico

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	R%	Rif.*	CV%	Rif.*	µg/L	Rif.**
Microcistine MC-LR: 1***	-	-	-	-	110	-	4	-	-	-

* DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

*** valore guida WHO

Microcistine: metodo ISS.CBA.044.rev.00

Metodo* in LC-MS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.* %	%	Rif.* %	%	Rif.** %
Microcistine										
MC-LR: 1***	0,01-0,04	-	-	-	85	-	10	-	-	-

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017 ***valore guida WHO

Microcistine: metodo ISS.CBA.053.rev.00

Metodo* in LC-MSMS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	R%	Rif.*	RSD%	Rif.*	%	Rif.**
Microcistine										
dem-MC-LR: ***	0,002- 0,025	-	-	-	85	-	25	-	-	-
dem-MC-RR: ***	0,002- 0,025	-	-	-	85	-	25	-	-	-
MC-LA: ***	0,002- 0,025	-	-	-	85	-	25	-	-	-
MC-LF: ***	0,002- 0,025	-	-	-	85	-	25	-	-	-
MC-LR: ***	0,002- 0,025	-	-	-	85	-	25	-	-	-
MC-LW: ***	0,002- 0,025	-	-	-	85	-	25	-	-	-
MC-LY: ***	0,002- 0,025	-	-	-	85	-	25	-	-	-
MC-RR: ***	0,002- 0,025	-	-	-	85	-	25	-	-	-
MC-YR: ***	0,002- 0,025	-	-	-	85	-	25	-	-	-

* DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

*** campo di applicazione: 0,1-10 µg/L

Nichel: metodo ISS.DAA.014.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Nichel 20	1	2 (10%)	4	6 (30%)	10	10	10	10	25	25

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

Ossidabilità al permanganato: metodo ISS.BEB.027.rev.00

Metodo* titrimetrico (secondo Kübel)

Valore (mg/L O ₂)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	mg/L O ₂	Rif.*	mg/L O ₂	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Ossidabilità 5,0	0,5	0,5 (10%)	1,5	1,5 (30%)	25	25	25	25	30	50%

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

PCB: metodo ISS.CAA.037.rev.00

Metodo* in AUTO-SPME-HS GC-MSMS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.***	R%	Rif.*	CV%	Rif.*	U%	Rif.**
#18 0,002	0,001	-	0,002	0,05	101	-	4	-	23	-
#28+31 0,002	0,001	-	0,002	0,05	99	-	4	-	57	-
#52 0,002	0,001	-	0,002	0,05	98	-	3	-	28	-
#44 0,002	0,001	-	0,002	0,05	99	-	3	-	21	-
#95 0,002	0,001	-	0,002	0,05	101	-	3	-	18	-
#101 0,002	0,001	-	0,002	0,05	100	-	3	-	24	-
#99 0,002	0,001	-	0,002	0,05	99	-	3	-	29	-
#81 0,002	0,001	-	0,002	0,05	101	-	5	-	28	-

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)										
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza		
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.***	R%	Rif.*	CV%	Rif.*	U%	Rif.**	
#110	0,002	0,001	-	0,002	0,05	103	-	4	-	17	-
#151	0,002	0,001	-	0,002	0,05	103	-	2	-	16	-
#77	0,002	0,001	-	0,002	0,05	103	-	4	-	20	-
#123	0,002	0,001	-	0,002	0,05	99	-	3	-	23	-
#149	0,002	0,001	-	0,002	0,05	101	-	3	-	28	-
#118	0,002	0,001	-	0,002	0,05	101	-	4	-	22	-
#146	0,002	0,001	-	0,002	0,05	100	-	3	-	22	-
#153	0,002	0,001	-	0,002	0,05	100	-	3	-	20	-
#114	0,002	0,001	-	0,002	0,05	104	-	3	-	16	-
#105	0,002	0,001	-	0,002	0,05	102	-	4	-	15	-
#138	0,002	0,001	-	0,002	0,05	101	-	3	-	20	-
#187	0,002	0,001	-	0,002	0,05	98	-	4	-	37	-
#183	0,002	0,001	-	0,002	0,05	98	-	4	-	37	-
#126	0,002	0,001	-	0,002	0,05	102	-	5	-	23	-
#128	0,002	0,001	-	0,002	0,05	102	-	3	-	22	-
#167	0,002	0,001	-	0,002	0,05	104	-	4	-	31	-
#177	0,002	0,001	-	0,002	0,05	100	-	3	-	24	-
#156	0,002	0,001	-	0,002	0,05	105	-	3	-	30	-
#180	0,002	0,001	-	0,002	0,05	101	-	4	-	21	-
#157	0,002	0,001	-	0,002	0,05	105	-	4	-	30	-
#169	0,002	0,001	-	0,002	0,05	105	-	5	-	57	-
#170	0,002	0,001	-	0,002	0,05	101	-	3	-	20	-
#189	0,002	0,001	-	0,002	0,05	103	-	4	-	34	-

* DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

*** DM 10 febbraio 2015

pH: metodo ISS.BCA.023.rev.00

Metodo* potenziometrico

Valore (unità pH)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	unità pH	Rif.*	unità pH	Rif.**	unità pH	Rif.*	unità pH	Rif.*	unità pH	Rif.**
pH ≥6,5 e ≤9,5	-	-	-	-	0,2	-	0,05	0,2	0,2	0,2

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

Piombo: metodo ISS.DAA.012.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Piombo 10	1	1 (10%)	3	3 (30%)	10	10	10	10	25	25

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

Rame: metodo ISS.DAA.009.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (mg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	mg/L	Rif.*	mg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Rame 1,0	0,001	0,1 (10%)	0,005	0,3 (30%)	10	10	10	10	25	25

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

Residuo fisso a 180°C: metodo ISS.BFA.032.rev.00

Metodo* gravimetrico

Valore (mg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	mg/L	Rif.*	mg/L	Rif.**	%	Rif.* %	%	Rif.* %	%	Rif.**
Residuo secco 180°C 1500***	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

***valore massimo consigliato

Selenio: metodo ISS.DAA.016.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Selenio 10	1	1 (10%)	3	3 (30%)	10	10	10	10	25	40

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Solidi indisciolti: metodo ISS.BFA.042.rev.00

Metodo* gravimetrico

Valore (mg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	mg/L	Rif.*	mg/L	Rif.**	%	Rif.* %	%	Rif.* %	%	Rif.** %
Solidi indisciolti -	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019

** DM 14 giugno 2017

Temperatura: metodo ISS.BBA.043.rev.00

Metodo* termometrico

Valore (°C)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	°C	Rif.*	°C	Rif.**	°C	Rif.*	°C	Rif.*	°C	Rif.**
Temperatura -	-	-	-	-	1	-	0,5	-	-	-

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

Torbidità: metodo ISS.BLA.030.rev.00

Metodo* nefelometrico alla formazina

Valore (NTU)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	NTU	Rif.*	NTU	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Torbidità 1***	0,25	0,25 (25%)	-	30	10	25	5	25	-	30

* DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017 *** valore da considerare parametrico nelle acque provenienti da impianti di trattamento, in caso di trattamento delle acque superficiali

Vanadio: metodo ISS.DAA.017.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Vanadio 140	5	-	-	-	20	-	20	-	20	-

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

Zinco: metodo ISS.DAA.049.rev.00

Metodo* in ETAAS

Valore (µg/L)	Caratteristiche di prestazione (validazione intralaboratorio) (valore in % del valore di parametro)									
	LOD		LOQ		Esattezza		Precisione		Incertezza	
	µg/L	Rif.*	µg/L	Rif.**	%	Rif.*	%	Rif.*	%	Rif.**
Zinco -	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*DL.vo 31/2001, fino al 31/12/2019 ** DM 14 giugno 2017

PARTE B
Metodi ISS revisionati e di nuova emissione

ISS.CAC.015.REV01

ANTIPARASSITARI: METODO SPE-GC (PARTE A) E METODO LC-HRMS (PARTE B)

0. Generalità e definizioni

I prodotti fitosanitari (erbicidi, insetticidi, acaricidi, fungicidi ecc.) sono le sostanze attive o i preparati contenenti una o più sostanze attive utilizzate per la lotta contro i parassiti delle piante e nel controllo delle infestanti nella pratica agronomica.

I residui di questi prodotti (le sostanze attive e i loro eventuali prodotti di degradazione) possono inquinare le acque superficiali e sotterranee in relazione alla loro solubilità, mobilità nel terreno e persistenza.

Alcune sostanze attive presenti nei prodotti fitosanitari, possono essere utilizzati come biocidi ovvero impiegati per eliminare un qualsiasi organismo nocivo per l'uomo, per le sue attività, per i prodotti che l'uomo impiega o produce, per gli animali o per l'ambiente, rendendoli innocui, impedendone l'azione o esercitando un qualsiasi altro effetto, con mezzi chimici o biologici.

La presenza dei residui nelle acque può essere determinata dall'utilizzo delle sostanze attive, sia come prodotti fitosanitari, sia come biocidi.

1. Campo di applicazione

Il metodo di prova è applicabile ad un elevato numero di residui di sostanze attive contenute, oltre che nelle acque da destinare e destinate al consumo umano, nelle acque minerali e nelle acque utilizzate per la produzione di acque per dialisi, indifferentemente di provenienza superficiale o sotterranea.

In funzione delle tecniche strumentali, e quindi della differente sensibilità intrinseca, è possibile monitorare i residui in un ampio intervallo di concentrazione. A partire almeno da 0,01 µg/L (limite di quantificazione), il metodo di prova consente determinazioni quantitative con esattezza e precisione compatibili con le caratteristiche di prestazione richiesti dalla normativa.

In Allegato A1 è riportato un elenco indicativo, non esaustivo, di sostanze attive che possono essere determinate, con il presente metodo di prova, sia in gascromatografia (GC), con rivelatori tradizionali (ECD, NPD) e in gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa (GC-MS). Il numero CAS, la sensibilità agli analizzatori selettivi, e gli ioni più significativi per l'analisi in spettrometria di massa completano l'allegato 1.

In Allegato A2 è riportato un elenco indicativo, non esaustivo, di sostanze attive con l'indicazione delle transizioni ioniche, che possono essere determinate, con il presente metodo di prova, in cromatografia gassosa abbinata alla spettrometria di massa tandem (GC-MSMS).

In Allegato A3 è riportato un elenco indicativo, non esaustivo, di sostanze attive con l'indicazione delle transizioni ioniche, che possono essere determinate, con il presente metodo di prova, in cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa (LC-MSMS).

In Allegato A4 è riportato un elenco indicativo, non esaustivo, di sostanze attive che possono essere determinate, con il presente metodo di prova, in cromatografia liquida abbinata all'alta risoluzione (HRMS).

2. Principio del metodo

Il metodo di prova, applicabile a tutte le sostanze attive analizzabili con tecnica multiresiduale, si basa sulla determinazione gascromatografia con analizzatori selettivi (GC-MS, GC-MSMS, HRMS, ecc.), parte A, e cromatografia liquida con analizzatore di massa (LC-MSMS, HRMS; ecc.) parte B, delle sostanze attive, dopo che queste sono state estratte dall'acqua con tecnica di estrazione in fase solida (SPE) con cartucce (tipo C-8 e tipo C-18), resine stirene divinilbenzene, con cartucce di carbone grafitato e nel caso della LC per iniezione diretta o per arricchimento on-line (tipo C-8 e tipo C-18), delle sostanze attive.

Il metodo di prova seppure consenta di analizzare anche residui di sostanze attive quantificabili, in gascromatografia, con i rivelatori NPD ed ECD, trova una più ampia applicazione con le tecniche liquide e gassose che prevedono l'utilizzo dello spettrometro di massa.

3. Interferenze e cause di errori

Le maggiori fonti di contaminazione e interferenze possono derivare dai solventi, dai reagenti, dalla vetreria e dai materiali plastici utilizzati, dalle stesse cartucce o dischi di estrazione in fase solida.

Si raccomanda pertanto l'adozione di particolari precauzioni finalizzate a ridurre questi inconvenienti.

Se si fa uso di *vial* per autocampionatore si raccomandano tappi con guarnizione a doppio strato silicone-teflon o con solo teflon; una volta forata la guarnizione, è raccomandata la sua sostituzione, se il campione dovesse essere conservato per successive analisi.

Tutta la vetreria utilizzata per l'analisi e il prelievo deve essere meticolosamente lavata con detergenti per vetreria, risciacquata con acqua ultrapura esente da tracce dell'analita.

I gas utilizzati per la cromatografia, liquida e gassosa, e l'azoto utilizzato per l'eventuale evaporazione degli estratti, devono essere esenti o a bassissimo tenore di ossigeno, umidità e composti organici volatili (VOC).

I solventi e gli altri reagenti devono essere di grado di purezza per l'analisi dei residui.

Deve essere condotta una analisi dei bianchi per avere informazioni sulla presenza di eventuali contaminanti o interferenti.

4. Campionamento e conservazione dei campioni

I campioni vengono prelevati in recipienti di vetro o bottiglie monouso di materiale plastico (es. PET).

Durante il trasporto:

- fra il punto di prelievo e il laboratorio: si devono adottare accorgimenti (es. piastre eutettiche, frigorifero portatile, ecc.) atti ad instaurare, un ambiente refrigerato.
- per il trasporto anche verso un altro laboratorio: la temperatura deve essere mantenuta fra +1 e +10°C.

In laboratorio, i campioni vanno conservati in frigorifero ad una temperatura di refrigerazione compresa nell'intervallo tra +1 e +10°C, fino al momento dell'analisi.

Si consiglia la tracciabilità delle temperature: dal campionamento, durante il trasporto, sino alla consegna in laboratorio e all'interno della struttura analitica.

Con i contenitori indicati e con le modalità di conservazione riportate la stabilità degli analiti è per almeno 15 giorni. Il valore si riferisce a periodi di conservazione per i quali è stato verificato che l'analita si è rilevato sostanzialmente stabile.

5. Apparecchiature

- (5.1) Normale attrezzatura e vetreria di laboratorio;
- (5.2) Dispositivo per l'aspirazione sottovuoto di cartucce SPE (es. VacElut™ 20 Manifold™);
- (5.3) Dispositivo per l'evaporazione in corrente di azoto (es. Turbovap™ LV);
- (5.4) Pompa a vuoto;
- (5.5) Evaporatore rotante (es. Rotavapor™ RE 121-BUCHI);
- (5.6) Bilancia analitica con precisione;
- (5.7) Strumenti analitici e accessori:
 - (5.7.1) Sistema gas-cromatografico con rivelatori selettivi di tipo azoto-fosforo (GC-NPD) e a cattura di elettroni (GC-ECD);
 - (5.7.2) Gascromatografo combinato con analizzatori di massa (si intende MS, MSn, inclusa la trappola ionica, la MSMS e HRMS);
 - (5.7.3) Colonne gascromatografiche: colonne capillari in silice fusa di lunghezza 25-30 m, diametro interno 0,25-0,32 mm, spessore film della fase stazionaria 0,10-0,25 µm, con fasi stazionarie quali ad esempio: metilsilicone o metilsilicone con 5% fenilsilicone; altre fasi stazionarie a diversa polarità, impiegabili per la conferma, quali ad esempio: metilsilicone con 50% fenilsilicone o cianopropilfenilsilicone;
 - (5.7.4) Cromatografo liquido combinato: MS, MSMS e HRMS;
 - (5.7.5) Colonne per cromatografia liquida, quali ad esempio: C8 e C18 (es. Atlantis™ T3, Aquity™ HSS T3, ecc.);
- (5.8) Filtri con porosità di 0,45 µm e 0,2 µm (es. filtri di vetro o d'estere di cellulosa);
- (5.9) Cartucce SPE per estrazione in fase solida (esempio: C-18, da 500 mg o polimeriche da 60 mg o carbone grafitizzato) (es. Bond Elut™ Varian 200 mg 6mL - Oasis™ HLB Water 60 mg/mL, ecc.);
- (5.10) Colonnine per arricchimento on-line (es. C-8, C-18 o simili);
- (5.11) Micropipette;
- (5.12) pHmetro;
- (5.13) Sistemi automatici o semiautomatici di estrazione del campione (es. Thermo-Autotrace).

6. Reagenti e materiali di riferimento

Tutti i reattivi e i solventi devono essere di purezza adeguata per l'analisi dei residui di prodotti fitosanitari:

- (6.1) Acqua milliQ;
- (6.2) Etile acetato;
- (6.3) Metanolo;
- (6.4) Sodio solfato anidro, preferibilmente granulare;

- (6.5) Terra di diatomee;
- (6.6) Acetone;
- (6.7) Acetonitrile;
- (6.8) Isoottano;
- (6.9) Acido formico;
- (6.10) Acetato d'ammonio;
- (6.11) Formiato d'ammonio;
- (6.12) Acido cloridrico;
- (6.13) Acido acetico;
- (6.14) Etanolo;
- (6.15) Cloruro di metilene;
- (6.16) Toluene;
- (6.17) *Soluzioni di materiali di riferimento*

Il laboratorio deve disporre di materiali di riferimento delle sostanze attive nel loro stato fisico originale o, in soluzione, per singolo composto o in miscela, a titolo noto, di elevata purezza e certificato. Le soluzioni dei materiali di riferimento vengono preparate sciogliendo il composto, adeguatamente conservato, preferibilmente in congelatore (T: $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$), in un solvente organico appropriato (es. acetone, metanolo, ecc.) tenendo conto della solubilità degli analiti. Per la preparazione delle soluzioni primarie si pesano, in genere, almeno 10 mg di composto. Le soluzioni primarie concentrate (circa 500-1000 $\mu\text{g/mL}$) delle sostanze attive sono stabili in linea generale per molti mesi (orientativamente 12-36 mesi se conservate in congelatore (T: $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$)) se tenute al riparo della luce e in contenitori di vetro ben chiusi per evitare perdite per evaporazione. Le soluzioni secondarie diluite (circa 10 $\mu\text{g/mL}$) hanno in genere un periodo di stabilità più breve (orientativamente 3-12 mesi se conservate a bassa temperatura, solitamente in frigorifero: T: $1-10^{\circ}\text{C}$). Le soluzioni diluite (di lavoro) dei materiali di riferimento (concentrazione $\leq 1 \mu\text{g/mL}$), devono essere indicativamente preparate con frequenza adeguata alla loro stabilità (orientativamente 1-2 mesi se conservate a bassa temperatura, solitamente in frigorifero, T: $1-10^{\circ}\text{C}$). Le miscele di più sostanze possono essere meno stabili delle soluzioni dei singoli analiti;
- (6.18) *Standard interno (internal standard)*

Lo standard interno è un particolare analita, aggiunto all'estratto finale prima della determinazione strumentale; deve avere elevata stabilità, non deve avere reattività con le sostanze attive da determinare deve essere sensibile ai detector utilizzati, avere un tempo di ritenzione intermedio ai composti da determinare e, nel caso di analizzatori diversi dagli spettrometri di massa, deve essere risolto gascromatograficamente rispetto alle sostanze attive da determinare. L'aggiunta di standard interno alla soluzione, prima dell'iniezione nel sistema cromatografico, rende indipendenti dal conoscere esattamente il volume finale e il volume iniettato. Si riportano, quale esempio, l'indicazione di alcune sostanze da utilizzare quali standard interno:

 - Trifenilfosfato,
 - Etion,
 - Composti deuterati o altri marcati;
- (6.19) *Standard di processo (surrogate)*

Lo standard di processo è un particolare analita che può essere aggiunto al campione prima dell'estrazione; serve per segnalare la presenza di possibili errori verificatisi durante l'analisi. Non deve essere una sostanza attiva presente nei campioni reali, deve avere un comportamento chimico analogo alle sostanze attive da determinare, deve avere elevata

stabilità, non deve possedere reattività con le sostanze attive da determinare, deve essere sensibile ai detector utilizzati e, nel caso di analizzatori diversi dagli spettrometri di massa, deve essere risolto gascromatograficamente rispetto alle sostanze attive da quantificare. Si riportano, quale esempio, l'indicazione di alcune sostanze da utilizzare come surrogato:

- Trifenilfosfato,
- Etion,
- Composti deuterati o altri marcati

Nota: le sostanze impiegate come standard interno devono differire da quelle utilizzate come standard di processo;

– (6.20) *Soluzione per il controllo della performance strumentale*

Allo scopo di verificare la performance strumentale, possono essere preparate soluzioni di varie sostanze attive a concentrazione nota, scelte in modo opportuno, ad esempio fra quelle riscontrate più frequentemente e fra quelle analiticamente più critiche. L'iniezione di questa soluzione consente di verificare il buon funzionamento e il grado di prestazione analitica dell'apparecchiatura come ad esempio: la sensibilità, la risoluzione, la linearità, la reattività (attivazione iniettore o colonna).

Per le soluzioni di cui ai punti 6.18, 6.19 e 6.20 le modalità di preparazione e i tempi di conservazione sono gli stessi delle soluzioni dei materiali di riferimento riportate al punto 6.17.

7. Procedimento

7.1. PARTE A - Estrazione delle sostanze attive e determinazione in gascromatografia (GC-MS, GC-MSMS, HRMS, ecc.)

7.1.1. Procedura estrattiva

La procedura di estrazione su cartuccia SPE è la seguente: il campione di acqua (500 mL), eventualmente filtrato sotto vuoto su filtro in fibra di vetro (5.8) o in esteri di cellulosa (5.8), viene addizionato di metanolo (0,5 mL ogni 100 mL di acqua) ed eventualmente dello standard di processo (6.19).

La soluzione così ottenuta viene passata attraverso una cartuccia SPE (5.9) condizionata per passaggio, ad una velocità di circa 500 mL/ora, e in successione, ad esempio: di 5 mL di etile acetato (6.2), 5 mL di metanolo (6.3), 10 mL di acqua (6.1), lasciando, un battente di alcuni millimetri.

Dopo il completo passaggio del campione (500 mL), il suo contenitore viene lavato con adeguati volumi di acqua (6.1) (es. 2 volte per 10 mL) e passato su cartuccia per favorire il recupero quantitativo del campione; l'acqua residua nella cartuccia viene eliminata mediante aspirazione o passaggio di azoto.

La cartuccia viene eluita con 5 mL di etile acetato (6.2). L'eluato può essere anidrificato ponendo, in serie alla cartuccia SPE, una cartuccia contenente sodio solfato anidro (6.4) o terra di diatomee (6.5); in questo caso sarà necessario un volume di etile acetato (6.2) di circa 10 mL.

L'eluato raccolto viene evaporato cautamente fino a secchezza o portato a piccolo volume con flusso di azoto. Per evitare la perdita di sostanze attive con elevati valori di tensione di vapore, è consigliabile addizionare all'eluato un piccolo volume di solvente keeper (es. isotano (6.8)), prima di procedere all'evaporazione.

Il residuo si riprende con 500 µL solvente adeguato (es. isotano, ecc.) per l'analisi strumentale unendo eventualmente lo standard interno (6.18), raggiungendo indicativamente, un fattore di concentrazione di 1000.

7.1.2. Identificazione in gascromatografia (es. GC-MS, GC-MSMS, HRMS, ecc.)

La tecnica di analisi è la gascromatografia capillare con analizzatori a spettrometria di massa (es. GC-MS, GC-MSMS, HRMS, ecc.)

In Allegato A6 si riporta, a titolo di esempio, le condizioni strumentali in gas massa per l'analisi delle sostanze riportate in allegato 1.

Negli Allegati A1 e A2, per ogni sostanza sono indicati gli ioni più significativi per l'analisi mediante spettrometria di massa.

Prima dell'uso, ogni apparecchiatura deve essere opportunamente tarata o soggetta ad un controllo della taratura.

Particolari accorgimenti consentono di prolungare e mantenere costante l'efficienza analitica degli strumenti: uso di pre-colonne, pulizia e silanizzazione dei liner d'iniezione, uso di setti a basso spurgo, periodica pulizia degli analizzatori e delle sorgenti, filtrazione dei gas di trasporto ecc.

Nell'Allegato A7 si riporta, a titolo di esempio, un'applicazione del metodo mediante l'impiego della GC-MSMS

7.2. PARTE B - Estrazione delle sostanze attive e determinazione in cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa (LC-MS, LC-MSMS, HRMS, ecc.)

7.2.1. Parte estrattiva con SPE off-line

Nel caso di estrazione con cartuccia: il campione di acqua (500 mL), eventualmente filtrato sotto vuoto su filtro in fibra di vetro e/o in esteri di cellulosa (5.8), viene addizionato di 0,5 mL ogni 100 mL di acqua di metanolo (6.3) ed eventualmente dello standard di processo (6.19).

In aggiunta per le sostanze attive acide, quali i diserbanti (es. Bentazone, 2,4 D, MCPA, MCPP, Dicamba, ecc.) è necessaria una apposita estrazione con preventiva acidificazione del campione fino a pH 2 con acido cloridrico (6.12), diluito 1:1, (ad ogni litro di acqua aggiungere circa 2-3 mL di acido cloridrico).

Il campione preparato viene caricato su una cartuccia SPE (5.9) condizionata per passaggio, ad una velocità di circa 500 mL/ora, e in successione: di 5 mL di etile acetato (6.2), 5 mL di metanolo (6.3), 10 mL di acqua (6.1), lasciando un battente di alcuni millimetri.

Dopo il completo passaggio del campione, la cartuccia viene lavata con (ad. es. 2 volte per 10 mL) acqua (6.1) per favorire il recupero quantitativo del campione; la maggior parte dell'acqua residua viene eliminata mediante aspirazione o meglio per passaggio di azoto.

La cartuccia viene eluita con 5 mL di etile acetato (6.2) o metanolo (6.3).

L'eluato raccolto viene evaporato cautamente a secchezza o a piccolo volume in corrente di azoto.

Il residuo si riprende con 500 µL di opportuno solvente per cromatografia liquida (es. fase mobile) eventualmente contenente lo standard interno (6.18) raggiungendo indicativamente un fattore di concentrazione di 1000.

7.2.2. Parte estrattiva con SPE on-line

È possibile utilizzare sistemi automatici on-line che abbinano la tecnica di estrazione SPE alla misura strumentale in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa.

In generale tali sistemi prevedono le seguenti fasi:

- condizionamento della colonna di arricchimento (C18 o equivalente);
- caricamento sulla colonna di arricchimento di un volume adeguato di campione (0,5-1,0 mL) in relazione alla sensibilità della strumentazione e alla concentrazione attesa;

- eluizione nella colonna analitica, in contro flusso, con la fase mobile utilizzata nella analisi cromatografica;
- lavaggio e condizionamento della colonna di arricchimento.

7.2.3. Iniezione diretta

È possibile utilizzare l'iniezione diretta del campione, eventualmente filtrato su filtro di vetro o su esteri di cellulosa, senza estrazione e concentrazione.

Tale tecnica trova applicazione qualora si disponga di una strumentazione (es. LC-MSMS o alta risoluzione-HRMS) che raggiunga i livelli di prestazione richiesti dalla normativa.

A differenza di quanto riportato al punto 7.2.1 l'analisi dei diserbanti acidi (es. Bentazone, 2,4 D, MCPA, MCPP, Dicamba, ecc.) viene condotta, come per gli altri analiti, senza alcuna acidificazione preventiva del campione.

Negli Allegati A8, A9 e A10 si riportano, a titolo di esempio, applicazione del metodo in iniezione diretta.

7.2.4. Identificazione e dosaggio delle sostanze attive in cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa (es. LC-MS, LC-MSMS, HRMS)

La soluzione ricostruita dell'estratto di cui al paragrafo 7.2.1 viene analizzata in cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa.

In Allegato A11 si riportano le condizioni strumentali in liquido massa per l'analisi delle sostanze riportate in Allegato A3.

Per ogni sostanza attiva sono riportate in allegato 3 le transizioni ioniche per la MSMS.

Prima dell'uso, ogni apparecchiatura deve essere opportunamente tarata o soggetta ad un controllo della taratura.

Particolari accorgimenti consentono di prolungare e mantenere costante l'efficienza analitica degli strumenti mediante l'utilizzo di solventi di grado analitico adeguato, pulizia frequente dei coni nebulizzatori, lavaggio periodico delle colonne cromatografiche.

Negli Allegati A8, A9 e A10 si riportano, a titolo di esempio, applicazione del metodo rispettivamente mediante l'impiego della LC-MSMS e HRMS.

8. Calcolo ed espressione dei risultati

8.1. Analisi qualitativa

L'analisi viene effettuata in gascromatografia abbinata agli analizzatori indicati al paragrafo 5.7.2 oppure con cromatografi liquidi indicati al paragrafo 5.7.4.

I rivelatori selettivi, di cui al paragrafo 5.7.1 offrono solo limitata specificità. Il loro uso, anche in combinazione con colonne di differente polarità, non fornisce una identificazione univoca. Per questo i risultati spesso sono confermati anche utilizzando una tecnica strumentale più specifica, come la spettrometria di massa. In effetti la spettrometria di massa, in combinazione con la gascromatografia o la cromatografia liquida, rappresenta una tecnica con caratteristiche migliorative per l'identificazione di un analita nel campione oggetto di analisi.

L'identificazione degli analiti avviene utilizzando diversi approcci, alcuni più immediati e applicabili con tutti gli analizzatori, altri più complessi. In ogni caso viene condotta per confronto con l'iniezione di una miscela di standard di riferimento, utilizzando diversi criteri.

Il Tempo di ritenzione (Tr) costituisce il criterio più semplice di riconoscimento dell'analita nel campione. Infatti il Tr deve corrispondere a quello dello standard di taratura all'interno di una determinata finestra dopo aver preso in considerazione il potere di risoluzione del sistema cromatografico, a parità di condizioni cromatografiche.

Tuttavia poiché il Tr può avere delle piccole variazioni nelle diverse corse cromatografiche, si consiglia di utilizzare il Tempo di ritenzione relativo, cioè il rapporto tra il tempo di ritenzione dell'analita e quello di un opportuno standard interno.

Il tempo di ritenzione corrisponde a quello medio degli standards con una tolleranza consigliata di $\pm 0,1$ min.

Con un analizzatore di massa si ha la conferma dell'identificazione dell'analita tramite i seguenti criteri:

- presenza di ioni specifici (si raccomandano almeno 3 per sistemi con quadrupolo e almeno 2 per sistemi MSMS, ion trap, Q-Trap, Q-Orbitrap);
- verifica del rapporto tra le intensità degli ioni specifici dell'analita riscontrati nel campione e quelli dell'analita nella miscela standard di riferimento (o in un campione *spiked* ad una concentrazione comparabile), e misurati nelle stesse condizioni. Le tolleranze per i due rapporti devono essere in accordo con quelle della Tabella 1.

Tabella 1. Tolleranze massime consentite per intensità di ioni relative utilizzando una gamma di tecniche di spettrometria di massa*

Rapporto ionico Meno intenso/più intenso	EI-GC-MS (relativa)	CI-GC-MS, GC-MSn, LC-MS, LC-MSn (relativa)
0,5-1,0	$\pm 10\%$	$\pm 30\%$
0,2-0,5	$\pm 15\%$	$\pm 30\%$
0,1-0,2	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
$\leq 0,10$	$\pm 50\%$	$\pm 30\%$

*Decisione della Commissione del 12 agosto 2002, paragrafo 2.3.3.2, Rilevazione con tecniche di spettrometria di massa

Altra tecnica di identificazione è il metodo delle aggiunte: si basa sull'arricchimento del campione con una piccola quantità di sostanza attiva nota, della quale si vuole escludere o meno la presenza.

Utilizzando lo spettrometro di massa ad alta risoluzione si deve rilevare la presenza degli analiti e i relativi frammenti con risoluzione di almeno 5 ppm e 4 cifre decimali.

8.2. Analisi quantitativa

L'analisi quantitativa si basa sul confronto delle aree dei picchi di un composto presente in un campione con quelle di uno o più standard.

Ogni analita viene dosato quantitativamente in base al valore dell'area o dell'area relativa (rapporto fra quella del picco d'interesse e quella dello standard interno).

Per ogni analita da quantificare vengono preparate soluzioni di taratura a concentrazione nota, ottenendo così una relazione che correla le aree con la quantità introdotta.

La taratura può essere effettuata su un unico livello, ad una concentrazione molto vicina a quella degli analiti da determinare quantitativamente oppure costruendo una curva di taratura multilivello.

I campioni in cui la concentrazione eccede il limite superiore della curva devono essere nuovamente analizzati dopo averli riportati entro l'intervallo di taratura, tramite diluizione del campione o per iniezione di un volume inferiore.

9. Prestazioni del metodo

Il laboratorio dovrà verificare l'applicazione del metodo di prova prima di eseguire le analisi sui campioni in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025.

In Allegato A5, relativamente ai dati di precisione ed esattezza, si riportano i risultati ottenuti in uno studio collaborativo riguardante l'applicazione del metodo APAT IRSA-CNR 5060 che possiede modalità operative identiche alla Parte A del presente metodo di prova.

Bibliografia

- Direzione generale della Salute e della sicurezza alimentare della Commissione europea. *SANTE/11945/2015 del 30 novembre 2015 Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed*. Bruxelles: DG SANV; 2015.
- Direzione generale della Salute e della sicurezza alimentare della Commissione europea. *SANCO/825/00 rev. 8.1 del 16 novembre 2010, Guidance document on pesticide residue analytical methods*. Bruxelles: DG SANV; 2010.
- Europa. Decisione 2002/657/CE della Commissione, del 12 agosto 2002, che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 221 del 17/8/2002.
- Greulich K, Alder L. Fast multi residue screening of 300 pesticides in drinking water. *Anal Bioanal Chem* 2008;391(1):183-97.
- ISO 7870-2:2013. *Control charts. Parts 2: Shewhart control charts*. Geneva: International Organization for Standardization; 2013.
- ISO 8466-1:1990. *Water quality: calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function*. Geneva: International Organization for Standardization; 1990.
- ISO 8466-2:1993. *Water quality: Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 2: Calibration strategy for non-linear second order calibration functions*. Geneva: International Organization for Standardization; 1993.
- ISO/TS 13530:2009. *Water quality - guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis*. Geneva: International Organization for Standardization; 2009.
- Magnusson B, Örnemark U (Ed.). *Eurachem Guide: the fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics*. 2nd ed. Torino: Eurachem; 2014.
- Mentasti E, Saini G. *Analisi chimica cromatografica*. Padova: Piccin; 1990.
- Ottaviani M, Bonadonna L (Ed.). *Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi chimici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità, 2007 (Rapporti ISTISAN 07/31).
- Patriarca M, Menditto A, Stacchini P. *Controllo della qualità interno: manuale per i laboratori di analisi chimiche. Quarta edizione (2011) del Nordtest Report TR 569. Traduzione italiana*. Roma: Istituto Superiore di Sanità, 2012. (Rapporti ISTISAN 12/29).

Allegati al metodo ISS.CAC.015.rev01

A1. Elenco (non esaustivo) di sostanze attive determinabili in GC e GC-MS

Sostanza attiva	CAS	Formula	PM	NPD	ECD	Ioni MS			
Alaclor	15972-60-8	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	269	✓	✓	160	188	146	238
Aldrin	309-00-2	C ₁₂ H ₆ Cl ₆	362	×	✓	66	261	263	265
Alfametrina	67375-30-8	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	415	✓	✓	163	165	181	209
Ametrina	834-12-8	C ₉ H ₁₇ N ₅ S	227	✓	×	227	212	170	185
Atrazina	1912-24-9	C ₆ H ₁₄ ClN ₅	215	✓	✓	200	202	215	217
Azinfos-Etile	2642-71-9	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂	345	✓	✓	132	160	77	105
Azinfos-Metile	86-50-0	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂	317	✓	✓	77	160	132	105
Benalaxil	71626-11-4	C ₂₀ H ₂₃ NO ₃	325	✓	×	148	206	204	176
Benfluralin	1861-40-1	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	335	✓	✓	292	264	145	318
Benzoilprop Etile	22212-55-1	C ₁₈ H ₁₇ Cl ₂ NO ₃	365	✓	✓	105	77	292	
Bitertanolo	55179-31-2	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂	337	✓	✓	170	168	171	112
Boscalid	188425-85-6	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	343	✓	✓	140	342	142	344
Bromofos-Etile	4824-78-6	C ₁₀ H ₁₂ BrCl ₂ O ₃ PS	392	✓	✓	357	359	301	303
Bromofos-Metile	2104-96-3	C ₈ H ₈ BrCl ₂ O ₃ PS	364	✓	✓	329	331	333	125
Bromopropilato	18181-80-1	C ₁₇ H ₁₆ Br ₂ O ₃	426	×	✓	339	341	183	185
Bupirimate	41483-43-6	C ₁₃ H ₂ N ₄ O ₃ S	316	✓	✓	273	208	316	166
Carbofenotion	786-19-6	C ₁₁ H ₁₆ ClO ₂ PS ₃	342	✓	✓	157	159	121	153
Carbofuran	1563-66-2	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221	✓	✓	164	149	122	121
Cianazina	21725-46-2	C ₉ H ₁₃ ClN ₆	240	✓	✓	225	227	172	198
Cicloate	1134-23-2	C ₁₁ H ₂₁ NOS	215	✓	×	83	154	215	
Clorfenson	80-33-1	C ₁₂ H ₈ Cl ₂ O ₃ S	302	×	✓	175	177	111	113
Clorfenvinfos	470-90-6	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P	358	✓	✓	267	269	323	325
Clorotalonil	1897-45-6	C ₈ Cl ₄ N ₂	264	✓	✓	264	266	268	133
Clorpirifos	2921-88-2	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	349	✓	✓	197	199	314	316
Clorpirifos-Metile	5598-13-0	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	321	✓	✓	286	288	125	109
Clorprofam	101-21-3	C ₁₀ H ₁₂ ClNO ₂	213	✓	✓	127	129	213	215
Clortal Dimetile	1861-32-1	C ₁₀ H ₆ Cl ₄ O ₄	330	×	✓	299	301	303	332
Clortoluron	15545-48-9	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O	212	✓	✓	72	212	214	
Cyproconazolo	94361-06-5	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O	292	✓	✓	222	139	224	125
Cyprodinil	121552-61-2	C ₁₄ H ₁₅ N ₃	225	✓	×	224	225	210	226
DDD, op	53-19-0	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	318	×	✓	235	237	165	199
DDD, pp	72-54-8	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	318	×	✓	235	237	165	199
DDE, op	3424-82-6	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	316	×	✓	246	248	316	318
DDE, pp	72-55-9	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	316	×	✓	246	248	316	318
DDT, op	784-02-6	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	352	×	✓	235	237	165	199
DDT, pp	50-29-3	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	352	×	✓	235	237	165	199
Diazinone	333-41-5	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	304	✓	✓	179	137	152	304
Diclobenil	1194-65-6	C ₇ H ₃ Cl ₂ N	171	✓	✓	171	173	100	136
Diclofluanide	1085-98-9	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂	332	✓	✓	123	167	224	226
Dieldrin	60-57-1	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	378	×	✓	79	263	277	237
Difenoconazole	119446-68-3	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	406	✓	✓	323	265	325	267
Dimetaclor	50563-36-5	C ₁₃ H ₁₈ ClNO ₂	255	✓	✓	134	197	199	
Dimethomorph	110488-70-5	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄	388	✓	✓	301	387	303	165
Dinitramina	29091-05-2	C ₁₁ H ₁₃ F ₃ N ₄ O ₄	322	✓	✓	305	307	261	232
Endosulfan Alfa	959-98-7	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	404	×	✓	195	237	239	241
Endosulfan Beta	33213-65-3	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	404	×	✓	195	237	239	241
Endosulfan Solfato	1031-07-8	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₄ S	420	×	✓	270	272	274	237
Endrin	72-20-8	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	378	×	✓	261	263	265	243
Eptacloro	76-44-8	C ₁₀ H ₅ Cl ₇	370	×	✓	100	270	272	274
Eptenofos	23560-59-0	C ₉ H ₁₂ ClO ₄ P	250	✓	✓	124	126	89	215
Esaconazolo	79983-71-4	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O	313	✓	✓	83	214	216	231
Etion	563-12-2	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	384	✓	✓	97	231	153	125

Sostanza attiva	CAS	Formula	PM	NPD	ECD	Ioni MS			
Etoprofos	13194-48-4	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂	242	✓	✓	158	97	126	200
Fenamidone	161326-34-7	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS	311	✓	✓	238	268	237	206
Fenamifos	22224-92-6	C ₁₃ H ₂₂ NO ₃ PS	303	✓	×	154	303	217	260
Fenarimol	60168-88-9	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	330	✓	✓	139	141	251	253
Fenclorfos	299-84-3	C ₈ H ₈ Cl ₃ O ₃ PS	320	✓	✓	285	287	125	109
Fenhexamid	126833-17-8	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ NO ₂	302	✓	✓	97	177	55	179
Fenitrotrion	122-14-5	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS	277	✓	✓	125	109	277	260
Fenson	80-38-6	C ₁₂ H ₆ ClO ₃ S	268	×	✓	77	141	268	270
Fention	55-38-9	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	278	✓	×	278	125	109	169
Fentoato	254642	C ₁₂ H ₁₇ O ₄ PS ₂	320	✓	✓	274	125	121	93
Fipronil	120068-37-3	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	437	✓	✓	367	369	213	368
Flamprop Isopropile	52756-22-6	C ₁₉ H ₁₉ ClFNO ₃	363	✓	✓	105	77	276	
Fludioxonil	131341-86-1	C ₁₂ H ₆ F ₂ N ₂ O ₂	248	✓	✓	248	127	154	182
Fluopicolide	239110-15-7	C ₁₄ H ₈ Cl ₃ F ₃ N ₂ O	384	✓	✓	347	349	209	173
Fluquinconazole	136426-54-5	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₃ O	376	✓	✓	340	207	342	108
Flusilazolo	85509-19-9	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ Si	315	✓	✓	233	206	234	315
Fluvalinate	69409-94-5	C ₂₆ H ₂₂ ClF ₃ N ₂ O ₃	502	✓	✓	250	252	209	181
Forate	298-02-2	C ₇ H ₁₇ O ₂ PS ₃	260	✓	✓	75	121	97	93
Fosalone	2310-17-0	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂	367	✓	✓	182	184	121	97
Fosfamidone	13171-21-6	C ₁₀ H ₁₉ ClNO ₅ P	299	✓	✓	127	264	72	138
Fosmet	732-11-6	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂	317	✓	✓	160	161	104	76
Furalaxil	57646-30-7	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	301	✓	×	95	242	152	
Indoxacarb	144171-61-9	C ₂₂ H ₁₇ ClF ₃ N ₃ O ₇	528	✓	✓	150	218	59	203
Iprodione	36734-19-7	C ₁₃ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₃	329	✓	✓	314	316	187	189
Iprovalicarb	140923-17-7	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃	320	✓	×	119	134	116	72
Isofenfos	25311-71-1	C ₁₅ H ₂₄ NO ₄ PS	345	✓	✓	213	121	185	255
Kresoxim methyl	143390-89-0	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	313	✓	✓	116	206	131	132
Isopropalin	33820-53-0	C ₁₅ H ₂₃ N ₃ O ₄	309	✓	✓	280	238	264	309
Lindano	58-89-9	C ₆ H ₆ Cl ₆	288	×	✓	181	183	217	219
Linuron	330-55-2	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	248	✓	✓	61	248	250	160
Malation	121-75-5	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330	✓	✓	127	125	173	158
Mepanipyrim	110235-47-7	C ₁₄ H ₁₃ N ₃	223	✓	×	222	223	221	224
Metalaxil	57837-19-1	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	279	✓	×	206	160	192	132
Metazaclor	67129-08-2	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O	277	✓	✓	81	132	133	134
Metidation	950-37-8	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	302	✓	✓	145	85	93	125
Metabenzthiazuron	18691-97-9	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ OS	221	✓	×	164	135		
Metobromuron	3060-89-7	C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₂	258	✓	✓	61	258	260	170
Metolaclor	51218-45-2	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	283	✓	✓	162	238	240	146
Metoprotina	841-06-5	C ₁₁ H ₂₁ N ₅ OS	271	✓	×	256	213	226	271
Miclobutanil	88671-89-0	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	288	✓	✓	179	181	150	152
Molinate	2212-67-1	C ₉ H ₁₇ NOS	187	✓	×	126	55	83	187
Nitrotal Isopropile	10552-74-6	C ₁₄ H ₁₇ NO ₆	295	✓	✓	236	194	212	254
Nuarimol	63284-71-9	C ₁₇ H ₁₂ ClFN ₂ O	314	✓	✓	235	237	314	316
Oxadiazon	19666-30-9	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₃	344	✓	✓	175	177	258	262
Oxadixil	77732-09-3	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄	278	✓	✓	163	132	233	278
Oxifluorfen	42874-03-3	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	361	✓	✓	252	361	363	300
Paration	56-38-2	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS	291	✓	✓	97	109	291	139
Paration-Metile	298-00-0	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS	264	✓	✓	109	125	263	93
Penconazolo	66246-88-6	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃	283	✓	✓	159	161	248	250
Pendimetalin	40487-42-1	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	281	✓	✓	252	162	192	281
Permetrina	52645-53-1	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	390	×	✓	183	163	165	127
Pirazofos	13457-18-6	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS	373	✓	✓	221	232	237	373
Piridafention	119-12-0	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₄ PS	340	✓	✓	199	340	125	188
Pirimicarb	23103-98-2	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	238	✓	×	166	72	238	123
Pirimifos-Metile	29232-93-7	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	305	✓	✓	290	276	305	233
Procimidone	32809-16-8	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	283	✓	✓	96	67	283	285
Procloraz	67747-09-5	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	375	✓	✓	144	130	145	102

Sostanza attiva	CAS	Formula	PM	NPD	ECD	Ioni MS			
Profam	122-42-9	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	179	✓	×	93	179	137	120
Profenofos	41198-08-7	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	372	✓	✓	206	208	139	339
Prometon	1610-18-0	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O	225	✓	×	210	225	183	168
Prometrina	7287-19-6	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	241	✓	×	184	241	226	199
Propaclor	1918-16-7	C ₁₁ H ₁₄ ClNO	211	✓	✓	120	176	211	213
Propazina	139-40-2	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	229	✓	✓	214	216	229	231
Propiconazolo	60207-90-1	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	341	✓	✓	173	175	259	261
Propizamide	23950-58-5	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ NO	255	✓	✓	173	175	255	257
Proquinazid	189278-12-4	C ₁₄ H ₁₇ IN ₂ O ₂	372	×	✓	288	372	245	272
Pyraclostrobin	175013-18-0	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	388	✓	✓	132	325	111	133
Pyrimethanil	53112-28-0	C ₁₂ H ₁₃ N ₃	199	✓	×	198	199	200	77
Quinalfos	13593-03-8	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS	298	✓	✓	146	157	156	298
Quinoxifen	124495-18-7	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO	308	✓	✓	237	272	307	309
Secbumeton	26259-45-0	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O	225	✓	×	196	169	225	210
Simazina	122-34-9	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201	✓	✓	201	203	186	188
Tebuconazolo	107534-96-3	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	308	✓	✓	250	125	70	83
Terbufos	13071-79-9	C ₉ H ₂₁ O ₂ PS ₃	288	✓	✓	231	153	288	186
Terbumeton	33693-04-8	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O	225	✓	×	169	210	154	225
Terbutilazina	5915-41-3	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	229	✓	✓	214	216	173	175
Terbutilazina Desetil		C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201	✓	×	186	188	201	
Terbutrina	886-50-0	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	241	✓	×	185	226	170	241
Tetraclorvinfos	22248-79-9	C ₁₀ H ₉ Cl ₄ O ₄ P	364	✓	✓	329	331	333	109
Tetraconazolo	112281-77-3	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O	372	✓	✓	336	338	337	171
Tetradifon	116-29-0	C ₁₂ H ₆ Cl ₄ O ₂ S	354	×	✓	354	356	159	161
Tiocarbazil	36756-79-3	C ₁₆ H ₂₅ NOS	279	✓	×	91	100	156	279
Tolclofos Metile	57018-04-9	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ O ₃ PS	300	✓	✓	265	267	125	93
Tolyfluanid	731-27-1	C ₁₀ H ₁₃ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂	347	✓	✓	137	238	240	181
Triadimefon	43121-43-3	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	293	✓	✓	57	208	210	128
Triadimenol	55219-65-3	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂	295	✓	✓	112	168	128	130
Triazofos	24017-47-8	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	313	✓	×	161	162	172	257
Trifloxistrobin	141517-21-7	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	408	✓	✓	116	131	222	132
Trifluralin	1582-09-8	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	335	✓	✓	306	264	307	206
Vinclozolin	50471-44-8	C ₁₂ H ₉ Cl ₂ NO ₃	285	✓	✓	212	214	285	287

PM: peso molecolare;

×: non rivelato dal detector;

✓: rivelato dal detector;

MS: masse di ioni caratteristici per l'analisi in GC-MS

A2. Elenco (non esaustivo) di sostanze attive determinabili in GC-MSMS

Sostanza attiva	massa mono-isotopica	Transizioni MSMS		Sensibilità	
Acephate	183,0	136>94	136>42	++	
Acetamidiprid	222,1	152>116	166>139		
Acetochlor	269,1	223>146	223>132	146>130	
Acibenzolar-S-Methyl	210,0	135>107	135>63		
Aclonifen	264,0	264>194	212>182	264>182	
Acrinathrin	541,1	289>93	289>77	181>152	
Alachlor	269,1	188>160	188>131		
Aldrin	361,9	293>257	293>192	263>192	
Allethrin	302,0	123>81	136>79	123>79	
Alphamethrin	415,1	181>152	163>91		
Amethryn	227,1	227>185	227>170	212>94	
Aminocarb	208,1	151>136	151>77	208>151	
Amitraz	299,1	293>162	293>132	293>106	+
Anilazine	274,0	239>143	239>177		+
Atrazine	215,1	200>122	215>173	215>200	++
Atrazine, desethyl-	187,1	172>69	172>104	187>172	++
Azinphos-ethyl	345,0	160>132	160>77		
Azinphos-methyl	318,0	160>132	160>77		
Azoxystrobin	403,1	344>329	344>156	403>344	+++
Benalaxyl	325,2	266>148	325>148	325>207	+++
Benfluralin	335,1	292>264	292>160	292>206	
Bentazone	240,1	198>119	198>92		
Benzthiazuron,	207,0	150>123	150>96		+
Bifenox	341,0	341>310	341>189	341>281	
Bifenthrin	439,2	181>166	181>115		+++
Bitertanol	337,2	170>141	141>115		
Boscalid	342,0	342>112	242>140	140>76	++
Bromophos	363,9	331>316	329>314	331>93	
Bromophos-ethyl	391,9	359>303	357>301		
Bromopropylate	426,0	341>183	341>155	341>185	
Buprofezin	305,2	305>140	305>172	172>57	+++
Captafol	346,9	79>51	183>79	313>79	
Captan	298,9	149>70	149>105	149>79	
Carbophenothion	342,0	342>157	199>143	199>97	++
Chlorbenside	268,0	125>89	268>125	268>127	+++
Chlordane, alpha-	405,8	373>266	373>301		
Chlordane, gamma-	405,8	373>266	373>301		
Chlorfenvinphos	358,0	267>159	267>81	269>161	
Chloridazon (Pyrazon)	221,0	221>77	221>105		+
Chlorothalonil	263,9	266>170	266>231		
Chlorpropham	213,1	213>127	213>127	127>65	
Chlorpyrifos	348,9	314>258	314>286	316>260	+++
Chlorpyrifos-methyl	320,9	286>93	286>63	288>93	+++
Chlorthal-dimethyl	329,9	330>221	330>221	330>299	
Coumaphos	362,0	362>109	362>334		
Cyanazine	240,1	225>189	198>91	240>225	++
Cycluron	198,2	127>72	198>89	198>72	+++
Cyfluthrin	433,1	226>206	206>151		
Cyhalothrin	449,1	181>152	208>181		
Cypermethrin	415,1	181>152	181>127		
Cyprodinil	225,1	224>208	224>118	225>108	+++
Cyprofuram	279,1	211>132	211>167	279>211	++
Cyromazine	166,1	151>109	166>151	151>82	++
DDD, o,p'-	317,0	235>165	237>165		
DDD, p,p'-	317,0	235>165	235>199	235>200	
DDE, o,p'-	315,9	246>176	318>248		
DDE, p,p'-	315,9	246>176	248>176		
DDT, o,p'-	351,9	235>165	237>165		
DDT, p,p'-	351,9	235>165	237>165		
Deltamethrin	503,0	253>93	253>172		
Demeton-O	258,1	171>115	171>143		
Demeton-S-methyl	230,0	142>112	230>88		
Diazinon	304,1	304>179	199>93	304>137	

Sostanza attiva	massa mono-isotopica	Transizioni MSMS			Sensibilità
Dibromobenzophenone, 4,4'- (metabolita)	337,9	340>185	340>261	340>157	+++
Dichlobenil	171,0	171>100	171>136		
Dichlorobenzamide, 2,6-	189,0	189>173	173>109	173>74	+++
Dichlorobenzophenone, p,p'-	250,0	250>139	252>141	250>215	+++
Dichlorvos	220,0	109>79	185>93	220>185	
Diclobutrazol	327,1	270>159	270>102	159>123	++
Diclofop-methyl	340,0	340>253	253>162	281>120	+++
Dicloran	206,0	206>176	206>124	281>148	+++
Dicrotophos	237,1	127>109	193>127	237>127	+
Dieldrin	377,9	345>263	279>243		
Diethofencarb	267,2	267>225	267>124	267>168	
Difenoconazole	405,1	323>265	323>202		
Dimethenamid	275,1	230>154	154>111	230>111	+++
Dimethoate	229,0	125>79	125>47	229>87	
Dimethomorph	387,1	301>165	301>152	301>199	++
Diniconazole	325,1	268>232	268>136	232>150	++
Diphenamid	239,1	239>167	239>72	239>116	+++
Diphenylamine	169,1	169>115	169>77		
Disulfoton	274,0	274>88	186>97	142>81	+++
Disulfoton sulfone	306,0	213>97	153>97	213>125	+
Disulfoton sulfoxide	290,0	125>97	212>97	153>97	
Endosulfan α	403,8	195>159	195>125	241>206	+++
Endosulfan β	403,8	195>159	195>125	241>206	++
Endosulfansulfate	419,8	387>289	387>206		++
Endrin	377,9	263>193	263>191		
Endrin, Keto-EPN	377,9	317>245	317>281	281>245	++
Epoxiconazol	329,1	192>138	192>75	165>138	++
EPTC	189,1	128>86	189>128	189>58	++
Esfenvalerate	419,1	419>125	419>167	419>225	
Etaconazole,	327,1	245>173	245>191	173>109	++
Ethalfuralin	333,1	316>276	333>276	276>202	+++
Ethiofencarb	225,1	107>77	168>107		
Ethion	384,0	231>185	231>175	231>129	
Ethofumesate	286,1	286>207	207>137	207>161	+++
Ethoprophos	242,1	158>114	200>158	158>97	
Ethoxyquin	217,1	202>174	217>174	202>130	+++
Etofenprox	376,2	163>135	163>107	163>77	+++
Etoxazole	359,2	300>270	300>103	359>187	++
Etridiazole	245,9	211>183	211>140		
Fenamidone	311,1	268>180	311>238	311>103	++
Fenamiphos sulfone	335,1	292>214	292>196	292>134	++
Fenamiphos sulfoxide	319,1	319>292	319>249	303>195	++
Fenarimol	330,0	219>107	219>79	330>139	+++
Fenazaquin	306,2	160>145	160>117	160>91	
Fenhexamid	301,0	177>78	177>113	301>97	
Fenitrothion	277,0	277>260	277>109	277>125	
Fenothiocarb	253,1	160>72	253>160	253>72	++
Fenpropathrin	349,2	181>152	349>181	265>210	
Fenpropidin	273,2	273>98	98>55	98>70	+++
Fenpropimorph	303,3	128>70	303>128	303>70	++
Fensulfothion	308,0	156>141	293>97	293>125	
Fensulfothion-sulfon	324,0	324>109	324>81	324>170	+++
Fenthion	278,0	278>109	278>169		
Fenvalerate	419,1	225>119	419>225		
Fenvalerate/Esfenvalerate	419,1	167>125	125>89	419>125	++
Fipronil	435,9	367>213	367>255	213>178	
Flonicamid	229,0	174>146	174>69	146>75	++
Fluacrypyrim	426,1	145>102	145>115	320>183	+++
Fluazifop-butyl	383,1	282>91	383>282	383>91	++
Flucythrinate	451,2	199>157	451>199	225>119	
Fludioxonil	248,0	248>127	248>154	248>182	+++
Flufenacet	363,1	151>136	151>95	211>123	++
Fluoxastrobin	458,1	188>144	188>116	188>89	+

Sostanza attiva	massa mono-isotopica	Transizioni MSMS			Sensibilità
Fluquinconazole	375,0	340>108	340>298	340>286	++
Flurochloridone	311,0	187>159	187>109	311>174	+
Flusilazole	315,2	233>165	233>152	206>151	
Flutolanil	323,1	323>173	323>145	323>281	
Flutriafol	301,1	219>123	219>95	164>95	+++
Fluvalinate	502,1	250>55	250>200		
Fonofos	246,0	137>109	246>137	246>109	++
Formothion	257,0	170>93	170>63	125>79	
Fosthiazate	283,1	195>103	195>139	195>60	
Fuberidazole	184,1	184>155	184>129	155>102	+++
Furalaxyl	301,1	242>95	301>225	152>94	+++
Haloxfop-etotyl	433,1	433>302	316>91	302>77	++
HCH, alpha-	288,0	219>183	219>145	254>183	
HCH, beta-	288,0	219>183	219>145	254>183	
HCH, delta-	288,0	183>147	181>145	254>183	
HCH, gamma-	288,0	219>183	219>145	181>145	
Heptachlor	369,8	272>237	272>143		
Hexachlorobenzene	281,8	284>249	286>214		
Hexaconazole	313,1	214>159	214>187	214>123	
Iprodione	329,0	314>245	314>271	314>56	+++
Isocarbophos	289,1	136>108	289>136	136>69	+++
Isodrin	361,9	193>123	263>193		
Isofenphos	345,1	213>121	213>185	185>121	
Isofenphos-methyl	331,1	199>65	199>93	199>121	
Isofenphosoxon	329,1	229>201	201>121	229>121	
Isoprocarb	193,1	136>121	121>77	121>103	
Isoprothiolane	290,1	290>118	290>204	189>89	
Isoxadifen-ethyl	295,1	294>204	204>176	222>178	+++
Kresoxim-methyl	313,1	206>116	206>131	313>206	+++
Lambda-Cyhalothrin	449,1	197>141	181>77	181>152	+++
Lenacil	234,1	153>136	153>110	234>153	
Linuron	248,0	248>61	250>61		
Malathion	330,0	173>127	173>99	285>127	+++
MCPA-methylester	214,0	141>77	214>155	155>89	+++
Mecarbam	329,1	329>159	329>131	329>97	
Mepanipyrim	223,1	223>207	222>107	222>118	+++
Mepanipyrim, Hydroxypropyl-	243,1	199>82	243>199	243>186	+++
Metalaxyl	279,2	206>132	206>105	279>174	+++
Metazachlor	277,1	209>133	277>133	133>117	+++
Methacrifos	240,0	125>79	180>93	180>79	+++
Methamidophos	141,0	141>95	141>64		
Methidathion	302,0	145>85	145>58		
Methiocarb	225,1	168>453	153>109	225>168	
Metolachlor	283,1	162>133	238>162		
Metolachlor, S-	238,1	238>133	238>162	162>133	+++
Metribuzin	214,1	198>82	198>110		
Metsulfuron-methyl	381,1	199>77	199>135	184>120	+
Mevinphos (E)	224,1	192>127	192>164		
Mevinphos (Z)	224,1	192>127	192>164		
Molinate	187,1	187>126	126>55	126>83	
Monolinuron	214,1	126>99	214>61		
Myclobutanil	288,1	179>125	288>179	288>152	
Nitrothal-isopropyl	295,1	236>194	236>148	236>120	+++
Nuarimol	314,1	235>139	203>107	314>139	+++
Omethoate	213,0	156>110	156>79		
Orthophenylphenol	170,1	170>41	170>15		+++
Oxadiazon	344,1	258>175	258>112	344>175	+++
Oxadixyl	278,1	163>132	163>117		
Paclobutrazol	293,1	236>125	236>167	236>132	
Paraoxon	275,1	275>149	247>149	275>99	++
Paraoxon-methyl	247,0	230>136	109>79	230>106	++
Parathion-ethyl	291,0	291>109	291>81		
Parathion-methyl	263,0	263>109	125>79	263>79	
Pencycuron	328,1	180>125	125>89		
Pendimethalin	281,1	252>162	252>191	281>252	+++
Pentanochlor	239,1	141>106	239>141	141>77	+++

Sostanza attiva	massa mono-isotopica	Transizioni MSMS			Sensibilità
Permethrin	390,1	183>168	183>153	183>155	
Pethoxamid	295,1	260>91	260>119	260>147	+++
Phenthoate	320,0	274>121	274>125	274>246	
Phorate	260,0	260>75	231>129	231>65	+++
Phorate-Sulfone	292,0	125>97	153>97	199>143	+++
Phorate-Sulfoxide	276,0	125>97	153>97	199>143	++
Phosalone	367,0	182>111	182>138	367>182	
Phosmet	317,0	160>133	160>77	317>160	
Phosphamidon	299,1	127>109	264>127	127>95	++
Picolinafen	376,1	238>145	238>95	376>238	++
Picoxystrobin	367,1	335>173	335>115	303>157	+++
Piperonyl butoxide	338,2	176>131	338>176	176>77	
Piperophos	353,1	320>122	140>98		
Pirimicarb	238,2	238>166	166>96	238>72	+++
Pirimicarb-desmethyl	224,0	152>96	224>152	224>96	+++
Pirimiphos-methyl	305,1	305>180	305>290	305>125	+++
Pretilachlor	311,2	162>147	162>132	262>202	
Probenazole	223,0	159>130	159>103		
Procymidone	283,0	283>96	283>67	283>255	+++
Procymidone	283,0	283>96	283>68	283>255	
Profenofos	372,0	337>267	339>269	372>337	
Profluralin	347,1	318>199	318>55		+++
Promecarb	207,1	150>135	135>91	150>91	++
Prometon	225,2	225>183	225>168	210>168	+++
Propanil	218,0	161>126	217>161		
Propaquizafop	443,1	163>100	443>371	443>299	++
Propargite	350,2	173>135	173>107	350>201	++
Propazine	229,1	229>187	214>172	229>58	+++
Propetamphos	281,1	236>194	236>166	194>166	+++
Propiconazole	341,1	173>145	259>69	259>173	
Propyzamide	255,0	173>145	173>109		
Prosulfocarb	251,1	251>128	251>86	162>91	++
Pymetrozine	217,1	113>98	132>105	217>98	+
Pyraclufos	360,1	360>194	360>139	360>97	
Pyralostrobin	387,1	132>77	164>132	164>77	++
Pyraflufen-ethyl	412,0	412>349	349>307	303>145	++
Pyrazophos	373,1	221>193	232>204	373>232	+++
Pyridaben	364,1	147>117	147>132	364>147	+++
Pyridaphenthion	340,1	340>199	340>125	340>109	
Pyrifenoxy	294,0	262>227	294>262	262>192	++
Pyrimethanil	199,1	198>183	198>118	198>77	+++
Pyriproxyfen	321,1	226>157	226>186	226>77	+++
Quinalphos	298,1	298>156	157>102	157>129	+++
Quinoxifen	307,0	307>272	307>237	309>237	+++
Quizalofop-ethyl	372,1	372>299	372>244	299>192	++
Simazine	201,1	201>173	201>186	201>138	+++
Spirodiclofen	410,1	312>259	312>109	312>81	
Spiromesifen	370,2	272>209	370>272	254>209	++
Spirotetramat	373,2	286>216	373>286	373>216	
Tebufenpyrad	333,2	333>171	333>318	333>276	++
Tebufenpyrad	333,2	333>171	171>88	333>276	
Tefluthrin	418,1	177>127	197>141	197>161	
Temephos	466,0	466>109	406>203	203>109	+
Terbucarb	277,2	220>205	220>177		++
Terbufos	288,1	231>175	153>97	288>231	
Terbufos-Sulfone	320,0	264>199	153>97	199>171	
Terbumeton	225,2	225>169	225>154	169>154	+++
Terbuthylazine	229,1	229>173	214>104	214>71	+
Terbuthylazine, Desethyl-	201,1	201>145	201>110	186>83	+
Terbutryn	241,1	241>185	241>170	241>111	+++
Tetrachlorvinphos	363,9	331>109	331>79	240>205	+++
Tetraconazole	371,0	336>204	336>218	336>191	+++
Tetramethrin	331,2	164>107	164>77	123>81	
Thiobencarb (Benthiocarb)	257,1	100>72	257>100	257>72	
Tolclofos-methyl	300,0	265>250	125>79	250>220	+++
Tolfenpyrad	383,1	383>171	383>211	197>91	

Sostanza attiva	massa mono-isotopica	Transizioni MSMS			Sensibilità
Tralomethrin	660,8	253>93	253>172	181>152	++
Triadimenol	295,1	168>70	128>65	128>100	
Tri-Allate	303,0	268>184	143>83	128>86	++
Triazophos	313,1	257>162	257>119		
Trichlorfon	255,9	145>109	145>127		
Tricyclazole	189,0	189>162	189>161		
Trifloxystrobin	408,1	222>190	222>130	222>162	+++
Trifluralin	335,1	335>248	335>264	335>202	+++
Vamidothion	287,0	145>87	169>125	169>109	++
Vinclozolin	285,0	285>198	285>212	287>200	+++

A3. Elenco di sostanze attive determinabili in LC-MSMS

Sostanza attiva	Ione molec.	Sens. ESI (+)	Sens. ESI (-)	ESI	Transizioni MSMS		
2,4,5-T	[M-H] ⁻			(-)	253>195	255>197	253>159
2,4-D	[M-H] ⁻		+++	(-)	219>161	219>125	221>163
2,4-DB	[M-H] ⁻		+++	(-)		247>161	247>125
2,4-DP (Dichlorprop)	[M-H] ⁻		+++	(-)	233>161	233>125	235>163
Abamectin (B1a)	[M+NH ₄] ⁺	+++		(+)	890,5>305,2	890,5>145,1	890,5>567
Acefate	[M+H] ⁺	++++		(+)	223>126	223>73	225>128
Acetamiprid	[M+H] ⁺	++++		(+)	223>126	223>73	225>128
Acetoclor	[M+H] ⁺			(+)	270>224	270>148	270>133
Aclonifen	[M+H] ⁺	++		(+)	265>182	265>218	265>248
Acrinatrina	[M+NH ₄] ⁺	+		(+)	559>208	559>181	
Alaclor	[M+H] ⁺	++++		(+)	270>238	270>162	
Aldicarb	[M+NH ₄] ⁺	++++		(+)	208>89		191>116
Aldicarb solfossido	[M+H] ⁺	++++		(+)	207>132	207>89	207>105
Aldicarb sulfone	[M+NH ₄] ⁺	++++		(+)	240>148	240>86	
Amidosulfuron	[M-H] ⁻		++	(-)		368>259	368>78
Atrazina	[M+H] ⁺	++++		(+)	216>174	216>104	218>176
Azimsulfuron	[M-H] ⁻		++	(-)		423>214	423>135
Azinfos etile	[M+H] ⁺	++++		(+)	346>132	346>160	
Azinfos metile	[M+H] ⁺	++++		(+)	318>132	318>160	318>125
Azoxistrobina	[M+H] ⁺	++++		(+)	404>372	404>344	
Benfuracarb	[M+H] ⁺	++++		(+)	411>195	411>252	
Bensulfuron metile	[M+H] ⁺	+++		(+)	411>149	411>119	
Bentazone	[M-H] ⁻		+++	(-)	239>132	239>197	239>175
Bifenox	[M+NH ₄] ⁺	++		(+)	359>310	359>189	
Bispyribac sodium	[M+H] ⁺	+++		(+)	453>297	453>421	
Bitertanolo	[M+H] ⁺	+++		(+)	338>70	338>269	338>99
Boscalid	[M+H] ⁺	++++		(+)	343>307	343>140	345>309
Bromacile	[M+H] ⁺	+++		(+)	261>205	261>188	
Bromacile	[M-H] ⁻			(-)	259>203	261>205	261>81
Bupirimate	[M+H] ⁺	++++		(+)	317>166	317>108	
Buprofezin	[M+H] ⁺	++++		(+)	306>201	306>116	306>106
Cadusafos	[M+H] ⁺	+++		(+)	271>159	271>97	271>215
Carbaril	[M+H] ⁺	++++		(+)	202>145	202>127	
Carbendazim	[M+H] ⁺	++++		(+)	192>160	192>132	
Carbofuran	[M+H] ⁺	++++		(+)	222>165	222>123	
Cianazina	[M+H] ⁺	+++		(+)	241>214	241>104	243>216
Cibutrina	[M+H] ⁺			(+)	254>198	254>108	
Cimoxanil	[M-H] ⁻		++	(-)		197>42	197>69
Cinosulfuron	[M+H] ⁺	+++		(+)	414>183	414>215	
Cinosulfuron	[M-H] ⁻			(-)	412>155	412>123	412>66
Cipermetrina	[M+NH ₄] ⁺	+++		(+)	433>191	433>127	435>193
Ciproconazolo	[M+H] ⁺	+++		(+)	292>70	292>125	294>70
Ciprodinil	[M+H] ⁺	+++		(+)	226>77	226>93	
Clodinafop Propargil	[M+H] ⁺	++++		(+)	350>266	350>91	
Clomazone	[M+H] ⁺	++++		(+)	240>125	240>89	
Clorantraniliprole	[M+H] ⁺	+++		(+)	482>284	484>453	486>455
Clorantraniliprole	[M-H] ⁻		++++	(-)	480>202	482>202	484>204
Clorfenvinfos	[M+H] ⁺	++++		(+)	359>155	359>99	
Cloridazon	[M+H] ⁺	++++		(+)	222>92	222>104	224>104
Clorotoluron	[M+H] ⁺	++++		(+)	213>72	213>140	
Clorpirifos	[M+H] ⁺	+++		(+)	350>97	350>198	
Clorpirifos metil	[M+H] ⁺	++		(+)	322>125	324>125	324>292
Clotianidin	[M+H] ⁺	+++		(+)	250>169	250>132	
Coumafos	[M+H] ⁺	++++		(+)	363>227	363>307	
Cycloxydim	[M-H] ⁻		+++	(-)		324>236	324>134
Cyromazine	[M+H] ⁺	+++		(+)	167>125	167>108	167>85
Dazomet	[M+H] ⁺			(+)	163>101	163>107	163>89
Demeton-S-metil	[M+H] ⁺	++++		(+)	231>89	231>61	
Demeton-S-metil-sulfone	[M+H] ⁺	++++		(+)	263>109	263>169	263>121
Desetilatraxina	[M+H] ⁺	+++		(+)	188>104	188>146	188>148
Desetilterbutilazina	[M+H] ⁺	++++		(+)	202>146	202>104	204>148
Desisopropilatraxina	[M+H] ⁺	+++		(+)	174>104	174>96	176>106

Sostanza attiva	Ione molec.	Sens. ESI (+)	Sens. ESI (-)	ESI	Transizioni MSMS		
Diazinone	[M+H] ⁺	++++		(+)	305>169	305>97	305>153
Diclorvos	[M+H] ⁺	+++		(+)	221>127	221>109	
Dicofol	[M-H] ⁻		+	(-)	367>117	369>119	371>121
Difenoconazole	[M+H] ⁺	++++		(+)	406>251	406>337	406>188
Dimetenamide	[M+H] ⁺	++++		(+)	276>244	276>168	278>246
Dimetoato	[M+H] ⁺	++++		(+)	230>125	230>199	230>171
Dimetomorf	[M+H] ⁺	++++		(+)	388>301	388>165	390>303
Disulfoton	[M+H] ⁺	+++		(+)	275>89	275>61	
Diuron	[M+H] ⁺	++++		(+)	233>72	233>160	235>72
Diuron	[M-H] ⁻			(-)	231>188	231>186	231>150
Dodemorf	[M+H] ⁺	++++		(+)	282>116	282>98	282>55
Dodine	[M-C ₂ H ₄ O ₂] ⁺			(+)	228>57	228>60	228>186
Epoxiconazole	[M+H] ⁺	+++		(+)	330>121	330>101	332>121
Eptenofos	[M+H] ⁺			(+)	251>127	251>109	251>125
Esafalumuron	[M-H] ⁻		+++	(-)	459>439	459>276	
Esazinone	[M+H] ⁺	++++		(+)	253>171	253>71	
Ethoxysulfuron	[M+H] ⁺	+++		(+)	399>261	399>218	
Etofenprox	[M+NH ₄] ⁺	++++		(+)	394>177	394>107	394>359
Etofumesate	[M+NH ₄] ⁺	+++		(+)	304>121	304>161	
Etoprofos	[M+H] ⁺	++++		(+)	243>131	243>97	243>173
Etoxazole	[M+H] ⁺	++++		(+)	360>141	360>113	360>177
Exitiazox	[M+H] ⁺	++++		(+)	353>228	353>168	355>230
Fenamidone	[M+H] ⁺	++++		(+)	312>92	312>236	
Fenamifos	[M+H] ⁺	++++		(+)	304>217	304>202	
Fenarimol	[M+H] ⁺	+++		(+)	331>81	331>268	331>139
Fenazaquin	[M+H] ⁺	+++		(+)	307>161	307>147	307>57
Fenbuconazole	[M+H] ⁺	++++		(+)	337>125	337>70	339>127
Fenexamid	[M+H] ⁺	+++		(+)	302>97	302>55	304>97
Fenexamid	[M-H] ⁻			(-)	300>264	302>266	302>264
Fenitroton	[M+H] ⁺	++		(+)	278>125	278>109	
Fenpiroximate	[M+H] ⁺	++++		(+)	422>366	422>135	422>107
Fenpropimorf	[M+H] ⁺	++++		(+)	304>147	304>117	
Fention	[M+H] ⁺	++++		(+)	279>169	279>247	279>205
Flonicamid	[M+H] ⁺			(+)	230>203	230>148	
Florasulam	[M+H] ⁺	+++		(+)	360>129	360>192	360>109
Fluazifop butile	[M+H] ⁺	++++		(+)	384>282	384>328	
Fludioxonil	[M-H] ⁻		+++	(-)	247>126	247>169	
Flufenacet	[M+H] ⁺	++++		(+)	364>194	364>152	364>124
Fluroxypyr	[M-H] ⁻		++	(-)		253>195	253>233
Fosalone	[M+H] ⁺	++		(+)	368>182	368>111	370>184
Fosmet	[M+H] ⁺	+++		(+)	318>133	318>160	318>77
Fostiazate	[M+H] ⁺	++++		(+)	284>104	284>228	284>200
Furalaxil	[M+H] ⁺			(+)	302>242	302>95	
Imazalil	[M+H] ⁺	++++		(+)	297>159	297>201	297>255
Imazamox	[M+H] ⁺	++		(+)	306>69	306>261	
Imazapyr	[M+H] ⁺			(+)	262>217	262>149	262>220
Imazosulfuron	[M-H] ⁻		+++	(-)		411>230	411>154
Imidacloprid	[M+H] ⁺	+++		(+)	256>175	256>209	258>211
Indoxacarb	[M+H] ⁺	+++		(+)	528>203	528>56	528>249
Iodosulfuron-metil-sodium	[M+H] ⁺	+++		(+)	508>167	508>141	
Ioxynil	[M-H] ⁻		++++	(-)	370>127	370>243	
Iprodione	[M+H] ⁺			(+)	330>101	330>143	330>245
Iprovalicarb	[M+H] ⁺	++++		(+)	321>119	321>203	
Isoproturon	[M+H] ⁺	+++		(+)	207>165	207>72	
Isoxaflutole	[M-H] ⁻		++	(-)		358>79	358>64
Kresoxim metil	[M+H] ⁺	+++		(+)	314>116	314>206	314>267
Lenacil	[M+H] ⁺	++++		(+)	235>153	235>136	
Linuron	[M+H] ⁺	++++		(+)	249>160	249>182	251>162
Malathion	[M+H] ⁺	++++		(+)	331>127	331>99	331>285
Mandipropamid	[M+H] ⁺	+++		(+)	412>356	412>328	414>330
MCPA	[M-H] ⁻		+++	(-)	199>141	201>143	199>155
Mecoprop(MCPP)	[M-H] ⁻		+++	(-)	213>141	215>143	213>71
Mepanipyrim	[M+H] ⁺	++++		(+)	224>77	224>106	
Mesosulfuron-metil	[M+H] ⁺	++++		(+)	504>182	504>83	504>306

Sostanza attiva	Ione molec.	Sens. ESI (+)	Sens. ESI (-)	ESI	Transizioni MSMS	
Mesotrione	[M+NH ₄] ⁺	++		(+)	357>340	357>228
Metalaxil	[M+H] ⁺			(+)	280>220	280>160 280>192
Metalaxil-M	[M+H] ⁺	++++		(+)	280>220	280>160
Metamitron	[M+H] ⁺	+++		(+)	203>175	203>104 203>77
Metazaclor	[M+H] ⁺	++++		(+)	278>210	278>134 280>212
Metidathion	[M+H] ⁺	++++		(+)	303>145	303>85
Metiocarb	[M+H] ⁺	++++		(+)	226>121	226>169 226>107
Metobromuron	[M+H] ⁺	++++		(+)	259>170	259>148 260>172
Metolaclor	[M+H] ⁺	++++		(+)	284>252	284>176 286>254
Metomil	[M+H] ⁺	+++		(+)	163>106	163>88 163>122
Metossifenozone	[M-H] ⁻			(-)	367>149	
Metribuzin	[M+H] ⁺	+++		(+)	215>187	215>84 215>74
Metsulfuron metil	[M+H] ⁺	++++		(+)	382>199	382>167 382>77
Metsulfuron metile	[M+H] ⁺	+++		(+)	382>167	382>56
Mevinfos	[M+H] ⁺	++++		(+)	225>127	225>193
Molinate	[M+H] ⁺	+++		(+)	188>83	188>126
Monolinuron	[M+H] ⁺	++++		(+)	215>126	215>148
Myclobutanil	[M+H] ⁺	+++		(+)	289>70	289>125 291>127
Nicosulfuron	[M+H] ⁺	+++		(+)	411>182	411>106
Ometoato	[M+H] ⁺	++++		(+)	214>109	214>125 214>183
Ossidemeton-metil	[M+H] ⁺	++++		(+)	247>169	247>109 247>125
Oxadiazon	[M+NH ₄] ⁺	++++		(+)	362>220	362>177
Oxadixil	[M+H] ⁺	+++		(+)	279>219	279>133
Oxamil	[M+NH ₄] ⁺	++++		(+)	237>72	237>90 237>220
Oxyfluorfen	[M+NH ₄] ⁺	+		(+)	379>316	379>237
Paration	[M+H] ⁺	++		(+)	292>236	292>97
Paration Metil	[M+H] ⁺			(+)	264>125	264>232 264>79
Penconazolo	[M+H] ⁺	+++		(+)	284>159	284>70 284>123
Pendimetalin	[M+H] ⁺	+++		(+)	282>212	282>194 282>118
Phetoxamid	[M+H] ⁺			(+)	296>250	296>131 298>252
Phorate	[M+NH ₄] ⁺	++		(+)	278>75	278>171
Picloram	[M-H] ⁻			(-)	239>195	239>123 239>159
Picoxystrobin	[M+H] ⁺	++++		(+)	368>145	368>205
Pimetrozine	[M+H] ⁺	++++		(+)	218>105	218>79 218>78
Pinoxaden	[M+H] ⁺	+++		(+)	401>317	401>57 401>131
Piraclostrobin	[M+H] ⁺	++++		(+)	388>194	388>163 390>194
Pirazofos	[M+H] ⁺			(+)	374>222	374>194
Pirimetaniil	[M+H] ⁺	++++		(+)	200>82	200>107 200>183
Pirimicarb	[M+H] ⁺	++++		(+)	239>72	239>182
Pirimifos metil	[M+H] ⁺	++++		(+)	306>108	306>164 306>67
Prometrina	[M+H] ⁺	++++		(+)	242>158	242>200 242>68
Propaclor	[M+H] ⁺	++++		(+)	212>170	212>94
Propamocarb	[M+H] ⁺	+++		(+)	189>102	189>144 189>74
Propargite	[M+NH ₄] ⁺	++++		(+)	368>175	368>231 351>231
Propazina	[M+H] ⁺	++++		(+)	230>146	230>188 230>174
Propiconazolo	[M+H] ⁺	+++		(+)	342>69	342>159 342>123
Propizamide	[M+H] ⁺	++++		(+)	256>173	256>190
Propizamide	[M-H] ⁻			(-)	254>145	254>228 256>230
Propoxur	[M+H] ⁺	++++		(+)	210>111	210>168
Prosulfuron	[M+H] ⁺	+++		(+)	420>141	420>167
Quinclorac	[M+H] ⁺			(+)	242>224	244>226 244>163
Quinoxifen	[M+H] ⁺	++++		(+)	308>162	308>197
Rimsulfuron	[M+H] ⁺	+++		(+)	432>182	432>182
Sebutilazina	[M+H] ⁺	++++		(+)	230>174	230>104 232>176
Simazina	[M+H] ⁺	+++		(+)	202>124	202>132 204>134
Spinosin A (Spinosad)	[M+H] ⁺	++++		(+)	732,5>142	732,5>98
Spirotetramat	[M+H] ⁺	+++		(+)	374>216	374>302 374>330
Spiroxamina	[M+H] ⁺	++++		(+)	298>144	298>100
Sulcotrione	[M+NH ₄] ⁺	++		(+)	346>329	346>139
Tebuconazolo	[M+H] ⁺	++++		(+)	308>70	308>125 310>70
Tebufenozide	[M+H] ⁺	+++		(+)	353>297	353>133
Tefluthrin	[M+NH ₄] ⁺	+		(+)	436>177	436>127
Terbumeton	[M+H] ⁺	++++		(+)	226>170	226>114 226>142
Terbutilazina	[M+H] ⁺	++++		(+)	230>174	230>104 232>176
Terbutrina	[M+H] ⁺	++++		(+)	242>186	242>68 242>96

Sostanza attiva	ione molec.	Sens. ESI (+)	Sens. ESI (-)	ESI	Transizioni MSMS		
Tetraconazole	[M+H] ⁺	++++		(+)	372>159	372>70	372>123
Tiabendazolo	[M+H] ⁺	+++		(+)	202>131	202>175	202>65
Tiacloprid	[M+H] ⁺	++++		(+)	253>126	253>186	255>128
Tiametoxam	[M+H] ⁺	++++		(+)	292>211	292>181	294>211
Tiobencarb	[M+H] ⁺			(+)	258>125	258>89	260>127
Tiofanato metile	[M+H] ⁺	++		(+)	343>151	343>151	
Tolclofos metil	[M+H] ⁺	++		(+)	301>269	301>175	303>271
Tolilfluanide	[M+NH ₄] ⁺	++++		(+)	364>238	364>137	
Tralkoxydim	[M+H] ⁺	++++		(+)	330>138		330>284
Triadimefon	[M+H] ⁺	+++		(+)	294>197	294>225	294>69
Triadimenol	[M+H] ⁺	+++		(+)	296>70	296>227	298>70
Triasulfuron	[M+H] ⁺	++++		(+)	402>167	402>141	402>139
Triazofos	[M+H] ⁺	++++		(+)	314>162	314>119	404>167
Tribenuron metile	[M+H] ⁺	++++		(+)	396>155	396>181	396>199
Tribenuron metile	[M-H] ⁻			(-)		394>153	394>55
Triciclazolo	[M+H] ⁺	+++		(+)	190>136	190>163	
Triclopyr	[M-H] ⁻		++	(-)			256>198
Triclorfon	[M+NH ₄] ⁺	+++		(+)	274>109	274>221	
Triticonazole	[M+H] ⁺	++++		(+)	318>70	318>125	
Zoxamide	[M+H] ⁺			(+)	336>187	336>159	338>189

A4. Elenco (non esaustivo) di sostanze attive determinabili in cromatografia liquida abbinata alla HRMS

Sostanza attiva	Formula	Massa esatta (monoisotopica)	[M+H] ⁺
Alachlor	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	269,1183	270,1255
Ametryn	C ₉ H ₁₇ N ₅ S	227,1205	228,1277
Atrazine	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215,0938	216,1011
Atrazine-desethyl	C ₆ H ₁₀ ClN ₅	187,0624	188,0697
Atrazine-desisopropyl	C ₅ H ₈ ClN ₅	173,0468	174,054
Azinphos-ethyl	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂	345,0371	346,0444
Azinphos-methyl	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂	317,0058	318,0131
Chlorpyrifos	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	348,9263	349,9336
Dact	C ₃ H ₄ ClN ₅	145,0155	146,0227
Dimethoate	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	228,9996	230,0069
Ethoprophos	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂	242,0564	243,0637
Etrimfos	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₄ PS	292,0646	293,0719
Fonofos	C ₁₀ H ₁₅ OPS ₂	246,0302	247,0375
Heptenophos	C ₉ H ₁₂ ClO ₄ P	250,0162	251,0235
Isofenphos	C ₁₅ H ₂₄ NO ₄ PS	345,1163	346,1236
Malathion	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	347,0626	348,0699
Methacrifos	C ₇ H ₁₃ O ₅ PS	257,0487	258,056
Methidathion	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	318,9884	319,9957
Metolachlor	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	283,1339	284,1412
Metribuzin	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS	214,0888	215,0961
Mevinphos	C ₇ H ₁₃ O ₆ P	241,0715	242,0788
Molinate	C ₉ H ₁₇ NOS	187,1031	188,1104
Oxadiazon	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₃	361,096	362,1033
Pendimenthalin	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	281,1375	282,1448
Phosalone	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂	384,0134	385,0207
Phosphamidon	C ₁₀ H ₁₉ ClNO ₅ P	316,0955	317,1028
Pirimiphos-ethyl	C ₁₃ H ₂₄ N ₃ O ₃ PS	333,1276	334,1349
Pirimiphos-methyl	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	305,0963	306,1036
Prometryn	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	241,1361	242,1434
Simazine	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201,0781	202,0854
Terbutylazine	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	229,1094	230,1167
Terbutylazine-desethyl	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201,0781	202,0853
Terbutryn	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	241,1361	242,1434

A5. Risultati degli studi collaborativi

Risultati dello studio collaborativo* - livello di concentrazione 0,1 µg/L

Sostanza attiva	Conc. attesa (µg/L)	S _r (µg/L)	S _R (µg/L)	R (%)
Alaclor	0,099	0,0070	0,0120	87
Atrazina	0,100	0,0070	0,0160	86
Clorpirifos	0,103	0,0100	0,0190	73
Lindano (HCH gamma)	0,103	0,0110	0,0200	75
Linuron	0,101	0,0110	0,0230	82
Metalaxil	0,099	0,0110	0,0250	100
Metolaclor	0,103	0,0090	0,0160	91
Oxadiazon	0,099	0,0050	0,0140	87
Oxadixil	0,101	0,0100	0,0320	100
Pendimetalin	0,100	0,0070	0,0160	76
Prometrina	0,109	0,0070	0,0250	89
Propizamide	0,100	0,0060	0,0120	89
Simazina	0,106	0,0060	0,0160	89
Terbumeton	0,102	0,0090	0,0170	93
Terbutilazina	0,100	0,0050	0,0110	87
Terbutilazina Desetil	0,102	0,0070	0,0150	90

S_r : scarto tipo di ripetibilità; S_R: scarto tipo di riproducibilità; R : recupero

(*) Laboratori che hanno partecipato allo studio collaborativo: ARPA Sicilia Palermo (coordinatore del progetto 4b Legge 93/01), ARPA Sicilia Ragusa, ARPA Sicilia Catania, ARPA Puglia Bari, ARPA Campania Napoli, ARPA Lazio Roma, ARPA Emilia Romagna Ferrara, ARPA Piemonte Asti, ARPA Lombardia Lecco, APPA Trento. Lo studio collaborativo riguardava all'applicazione del metodo APAT IRSA-CNR 5060 adottando modalità operative identiche alla Parte A del presente metodo

Risultati dello studio collaborativo* - livello di concentrazione 0,5 µg/L

Sostanza attiva	Conc. attesa (µg/L)	S _r (µg/L)	S _R (µg/L)	R (%)
Alaclor	0,495	0,0320	0,0560	87
Atrazina	0,500	0,0280	0,0590	86
Clorpirifos	0,513	0,0300	0,0670	73
Lindano (HCH gamma)	0,516	0,0510	0,0800	75
Linuron	0,504	0,0550	0,1150	82
Metalaxil	0,497	0,0380	0,0810	100
Metolaclor	0,513	0,0280	0,0650	91
Oxadiazon	0,495	0,0250	0,0730	87
Oxadixil	0,507	0,0370	0,0890	100
Pendimetalin	0,499	0,0320	0,0670	76
Prometrina	0,546	0,0410	0,0880	89
Propizamide	0,499	0,0350	0,0810	89
Simazina	0,532	0,0340	0,0780	89
Terbumeton	0,508	0,0280	0,0720	93
Terbutilazina	0,500	0,0270	0,0730	87
Terbutilazina Desetil	0,509	0,0320	0,0750	90

S_r : scarto tipo di ripetibilità; S_R: scarto tipo di riproducibilità; R : recupero

(*) Laboratori che hanno partecipato allo studio collaborativo: ARPA Sicilia Palermo (coordinatore del progetto 4b Legge 93/01), ARPA Sicilia Ragusa, ARPA Sicilia Catania, ARPA Puglia Bari, ARPA Campania Napoli, ARPA Lazio Roma, ARPA Emilia Romagna Ferrara, ARPA Piemonte Asti, ARPA Lombardia Lecco, APPA Trento. Lo studio collaborativo riguardava all'applicazione del metodo APAT IRSA-CNR 5060 adottando modalità operative identiche alla Parte A del presente metodo.

A6. Esempio di condizioni operative in GC-MS

Parametro operativo	Valore/settaggio
Colonna	Equity 5- Supelco
Iniettore	Split/splitless
Modalità di iniezione	Pulsed splitless
Carrier gas	elio
Flusso (mL/min)	1,3
Programmata di temperatura	
1° step	70°C per 3 min
Rampa 1	25°C/min sino a 150°C
Rampa 2	5°C/min sino a 280°C
Step finale	280°C per 30 min
Transfer line (°C)	260°C
Volume iniettato (µL)	2 µL

A7. Parte A: GC-MSMS, SPE Offline – concentrazione 0,1 µg/L

Sostanza attiva	LOQ (µg/L)	S _r (µg/L)	CV (%)	Ue (µg/L)	Esattezza (%)
Aclonifen	0,025	0,0076	6,6	0,041	102,8
Azinfos etil	0,025	0,0055	4,7	0,039	104,6
Azinfos metil	0,025	0,0043	3,5	0,041	111,9
Boscalid	0,025	0,0041	3,9	0,035	102,6
Bupirimate	0,025	0,0074	6,7	0,039	106,6
Ciprodinil	0,025	0,0039	3,8	0,035	118,1
Difenoconazolo	0,025	0,0107	10,6	0,040	112,2
Dimetomorph	0,025	0,0087	8,6	0,037	103,5
Endosulfan solfato	0,025	0,0069	6,1	0,039	101,2
Epossiconazolo	0,025	0,0061	5,1	0,041	109,8
Fenamidone	0,025	0,0057	4,4	0,044	104,8
Fenarimol	0,025	0,0045	3,9	0,039	102,1
Fenbuconazolo	0,025	0,0082	8,1	0,037	107,8
Flusilazolo	0,025	0,0067	5,7	0,041	107,2
Fosalone	0,025	0,0075	7,0	0,038	102,3
Kresoxim-methyl	0,025	0,0060	5,5	0,038	101,1
Metossicloro	0,025	0,0086	8,5	0,038	119,1
Myclobutanil	0,025	0,0057	4,7	0,041	104,7
p, p DDD	0,025	0,0084	8,6	0,036	119,9
Parathion	0,025	0,0057	6,3	0,032	124,5
Procloraz	0,025	0,0113	11,0	0,041	114,9
Propiconazolo	0,025	0,0071	6,3	0,040	105,1
Tebuconazolo	0,025	0,0067	5,1	0,045	106,2
Trifloxistrobina	0,025	0,0085	9,1	0,035	118,1

Note: Il Laboratorio ha considerato il LOQ come Punto più basso di calibrazione, il ovvero Limite di Prestazione da DL.vo 31/2001;

LOQ: limite di quantificazione; S_r: scarto tipo di ripetibilità; CV: coefficiente di variazione; Ue: incertezza estesa

**A8. Parte B: LC-MSMS,
iniezione diretta – concentrazione 0,1 µg/L**

Sostanza attiva	Esattezza (%)	LOD calc (µg/L)	LOQ calc. (µg/L)	LOQ appl. (µg/L)	S _r (µg/L)	CV (%)	δi (µg/L)	Ue (µg/L)
Acetamidrid	104,9	0,0052	0,0067	0,01	0,0034	3,25	0,0052	0,0093
Acetoclor	110,1	0,0083	0,0186	0,02	0,0047	4,27	0,0106	0,0180
Aclonifen	97,5	0,0098	0,0174	0,02	0,0057	5,83	0,0091	0,0125
Atrazine	103,9	0,0048	0,0069	0,01	0,0026	2,53	0,0071	0,0089
Azoxystrobin	106,8	0,0064	0,0088	0,01	0,0090	8,44	0,0102	0,0214
Bensulfuron-methyl	106,1	0,0057	0,0076	0,01	0,0064	5,98	0,0095	0,0222
Bentazone	101,3	0,0228	0,0288	0,05	0,0026	2,55	0,0114	0,0258
Bifenazate	72,7	0,0088	0,0150	0,01	0,0103	14,11	0,0135	0,0269
Boscalid	95,3	0,0067	0,0126	0,01	0,0046	4,85	0,0100	0,0212
Bupirimate	101,0	0,0053	0,0066	0,01	0,0080	7,91	0,0084	0,0143
Carbofuran	104,5	0,0050	0,0059	0,01	0,0022	2,14	0,0051	0,0104
Chloridazon	99,4	0,0052	0,0071	0,01	0,0032	3,19	0,0071	0,0157
Chlorpyrifos	95,6	0,0057	0,0082	0,01	0,0038	3,99	0,0041	0,0076
Chlorpyrifos-methyl	97,8	0,0081	0,0149	0,01	0,0042	4,25	0,0058	0,0099
Chlortoluron	102,1	0,0050	0,0062	0,01	0,0025	2,42	0,0053	0,0112
Clorantranilprole	102,4	0,0068	0,0096	0,01	0,0065	6,35	0,0096	0,0214
Cymoxanil	95,5	0,0051	0,0071	0,01	0,0033	3,44	0,0055	0,0084
Cyprodinil	106,6	0,0083	0,0175	0,02	0,0050	4,76	0,0050	0,0103
Desetilatrizona	101,2	0,0047	0,0060	0,01	0,0026	2,61	0,0049	0,0093
desetilterbutilazina	105,1	0,0047	0,0067	0,01	0,0024	2,26	0,0078	0,0116
desisopropilAtrizona	102,6	0,0044	0,0054	0,01	0,0024	2,38	0,0046	0,0068
Dichlorvos	104,5	0,0120	0,0231	0,02	0,0043	4,10	0,0109	0,0245
Difenoconazole	98,3	0,0058	0,0079	0,05	0,0066	6,75	0,0081	0,0188
Dimethenamide	106,1	0,0123	0,0141	0,01	0,0058	5,51	0,0062	0,0127
Dimethoate	102,5	0,0049	0,0061	0,01	0,0035	3,39	0,0055	0,0106
Diuron	101,1	0,0062	0,0105	0,01	0,0048	4,79	0,0072	0,0126
Epoxiconazole	102,9	0,0069	0,0094	0,01	0,0044	4,26	0,0078	0,0156
Ethofumesate	98,9	0,0059	0,0126	0,01	0,0039	3,91	0,0077	0,0155
Fenbuconazole	107,0	0,0074	0,0141	0,01	0,0070	6,56	0,0109	0,0244
Flufenacet	101,3	0,0053	0,0068	0,01	0,0054	5,33	0,0100	0,0184
Fosalone	100,8	0,0041	0,0056	0,01	0,0051	5,03	0,0055	0,0111
Imidacloprid	108,2	0,0051	0,0056	0,01	0,0014	1,29	0,0057	0,0085
Indoxacarb	84,5	0,0070	0,0116	0,01	0,0086	10,12	0,0103	0,0222
lprovalicarb	105,2	0,0058	0,0081	0,01	0,0034	3,23	0,0044	0,0074
isoproturon	103,7	0,0050	0,0066	0,01	0,0038	3,67	0,0049	0,0116
Isoxaflutole	106,1	0,0090	0,0167	0,02	0,0053	5,01	0,0105	0,0150
Kresoxim-methyl	104,3	0,0068	0,0103	0,01	0,0034	3,24	0,0055	0,0124
Lenacil	105,3	0,0051	0,0081	0,01	0,0036	3,38	0,0070	0,0151
Linuron	107,9	0,0061	0,0081	0,01	0,0060	5,51	0,0065	0,0119
Malathion	100,8	0,0048	0,0108	0,01	0,0053	5,22	0,0063	0,0115
Mandipropamid	109,8	0,0054	0,0085	0,01	0,0048	4,34	0,0066	0,0114
MCPA	104,3	0,0245	0,0348	0,05	0,0035	3,39	0,0063	0,0097
MCPP(*)	104,4	0,0241	0,0284	0,05	0,0030	2,85	0,0093	0,0168
Mepanipirim	104,3	0,0064	0,0099	0,01	0,0025	2,37	0,0042	0,0067
Metalaxyl	103,4	0,0057	0,0081	0,01	0,0026	2,51	0,0052	0,0107
Metamitron	95,5	0,0052	0,0078	0,01	0,0015	1,56	0,0065	0,0127
Metazachlor	106,9	0,0056	0,0072	0,01	0,0050	4,70	0,0065	0,0134
Methidathion	111,7	0,0058	0,0110	0,01	0,0094	8,43	0,0103	0,0257
Methoxyfenozide	99,6	0,0072	0,0107	0,01	0,0105	10,50	0,0132	0,0335
Metobromuron	101,17	0,0064	0,0097	0,01	0,0019	1,87	0,0050	0,0086
Metolachlor	102,45	0,0055	0,0069	0,01	0,0037	3,60	0,0052	0,0108
Metribuzin	102,48	0,0064	0,0122	0,01	0,0024	2,31	0,0065	0,0119
Paration Etile	112,23	0,0067	0,0124	0,01	0,0100	8,90	0,0103	0,0158
Penconazole	100,78	0,0054	0,0076	0,01	0,0042	4,13	0,0056	0,0082
Pendimetalin	91,8	0,0057	0,0076	0,01	0,0025	2,74	0,0040	0,0076
Phetoxamid	99,63	0,0049	0,0069	0,01	0,0033	3,26	0,0055	0,0127
Pirimicarb	104,18	0,0052	0,0061	0,01	0,0035	3,36	0,0055	0,0118
Propachlor	102,97	0,0057	0,0073	0,01	0,0039	3,78	0,0062	0,0114
Propazine	102,9	0,0052	0,0062	0,01	0,0040	3,87	0,0053	0,0095
Propiconazole	103,68	0,0047	0,0078	0,01	0,0060	5,78	0,0066	0,0115
Propyzamide	102,5	0,0050	0,0067	0,01	0,0026	2,57	0,0042	0,0102

Sostanza attiva	Esattezza (%)	LOD calc (µg/L)	LOQ calc. (µg/L)	LOQ appl. (µg/L)	S _r (µg/L)	CV (%)	δi (µg/L)	Ue (µg/L)
Pyraclostrobin	99,67	0,0039	0,0055	0,01	0,0049	4,90	0,0070	0,0119
Pyrimethanil	108,6	0,0074	0,0145	0,01	0,0027	2,45	0,0053	0,0127
Simazine	105,2	0,0057	0,0081	0,01	0,0037	3,53	0,0040	0,0091
Spirotetramat	95,2	0,0049	0,0070	0,01	0,0070	7,34	0,0071	0,0132
Spiroxamine	94,22	0,0041	0,0046	0,01	0,0058	6,18	0,0069	0,0172
Tebufenozide	90,10	0,0067	0,0118	0,01	0,0122	13,53	0,0123	0,0233
Terbutylazine	102,8	0,0048	0,0065	0,01	0,0060	5,81	0,0065	0,0146
Tetraconazole	103,20	0,0073	0,0110	0,01	0,0083	8,06	0,0094	0,0224
Thiacloprid	103,07	0,0048	0,0052	0,01	0,0023	2,20	0,0046	0,0091
Thiamethoxam	103,58	0,0049	0,0054	0,01	0,0019	1,87	0,0061	0,0085
Thiobencarb	103,85	0,0043	0,0058	0,01	0,0016	1,50	0,0047	0,0063
Triticonazole	103,65	0,0071	0,0117	0,01	0,0074	7,12	0,0088	0,0193
Zoxamide	93,3	0,0107	0,0190	0,02	0,0068	7,24	0,0084	0,0094
2,4-D	102,73	0,0275	0,0408	0,05	0,0031	2,97	0,0108	0,0193
2,4-DP (Dichlorprop)	109,68	0,0263	0,0417	0,05	0,0066	6,01	0,0076	0,0123

LOD: limite di rilevazione; LOQ: limite di quantificazione; S_r: scarto tipo di ripetibilità; CV: coefficiente di variazione; δi: scarto tipo di ripetibilità intermedia (ISO 13530); Ue: incertezza estesa;

**A9. Parte B: LC-MSMS mod. Waters Xevo TQ-S,
iniezione diretta – concentrazione 0,1 µg/L**

Sostanza attiva	LOD calc (µg/L)	LOQ calc. (µg/L)	LOQ appl. (µg/L)	CV ripetib. (%)
2,4,5-T	0,0045	0,0159	0,02	6,35
2,4-D	0,0025	0,0089	0,01	7,15
Acephate	0,0042	0,0150	0,02	6,01
Acetamiprid	0,0001	0,0004	0,01	7,47
Aldicarb sulfone	0,0010	0,0034	0,01	6,81
Amidosulfuron	0,0019	0,0067	0,01	5,36
Atrazine	0,0005	0,0017	0,01	6,92
Atrazine-desethyl	0,0002	0,0007	0,01	7,26
Azinphos-ethyl	0,0011	0,0039	0,01	7,82
Azinphos-methyl	0,0037	0,0132	0,02	5,28
Azoxystrobin	0,0009	0,0031	0,01	6,23
Benfuracarb	0,0023	0,0081	0,01	8,13
Bentazone	0,0015	0,0052	0,01	4,16
Bitertanol	0,0067	0,0237	0,05	9,46
Boscalid	0,0006	0,0020	0,01	7,97
Bupirimate	0,0009	0,0031	0,01	6,16
Buprofezin	0,0003	0,0009	0,01	9,16
Cadusafos	0,0006	0,0021	0,01	8,42
Carbaryl	0,0051	0,0179	0,02	7,16
Carbendazim	0,0027	0,0096	0,01	9,55
Carbofuran	0,0002	0,0008	0,01	7,99
Chlorfenvinphos	0,0009	0,0033	0,01	2,61
Chlorpyrifos Ethyl	0,0012	0,0042	0,01	8,34
Cibutrina	0,0013	0,0046	0,01	9,20
Clodinafop-propargyl	0,0005	0,0019	0,01	7,71
Clomazone	0,0023	0,0081	0,01	8,06
Clothianidin	0,0004	0,0014	0,01	5,78
Coumaphos	0,0007	0,0024	0,01	9,71
Cymoxanil	0,0045	0,0160	0,02	6,39
Cyproconazole	0,0026	0,0092	0,01	3,66
Cyprodinil	0,0014	0,0051	0,01	10,17
Demeton-S-methyl-sulfon	0,0002	0,0008	0,01	8,20
Diazinon	0,0016	0,0058	0,01	5,75
Dichlorvos	0,0028	0,0099	0,01	9,91
Dimethoate	0,0002	0,0008	0,01	3,13
Dimethomorph	0,0010	0,0034	0,01	6,71
Diuron	0,0004	0,0012	0,01	4,98
Dodemorph	0,0007	0,0023	0,01	9,32
Etoxazole	0,0015	0,0053	0,01	5,30
Fenamidone	0,0003	0,0009	0,01	9,23
Fenamiphos	0,0002	0,0008	0,01	8,24
Fenarimol	0,0010	0,0037	0,01	7,33
Fenazaquin	0,0027	0,0095	0,01	9,52
Fenhexamid	0,0012	0,0042	0,01	8,34
Fenpropimorph	0,0028	0,0098	0,01	9,76
Fenpyroximat	0,0019	0,0068	0,01	6,82
Fenthion	0,0012	0,0042	0,01	8,48
Flonicamid	0,0011	0,0039	0,01	7,87
Florasulam	0,0001	0,0005	0,01	10,35
Fluazifop-P-butyl	0,0012	0,0042	0,01	8,49
Fludioxonil	0,0022	0,0080	0,01	6,36
Fluroxypyr	0,0024	0,0084	0,01	8,37
Fosthiazate	0,0002	0,0007	0,01	6,56
Furalaxil	0,0003	0,0010	0,01	9,57
Heptenofos	0,0013	0,0046	0,01	9,26
Hexaflumuron	0,0064	0,0228	0,02	9,14
Hexythiazox	0,0020	0,0071	0,01	7,14
Imazamox	0,0007	0,0025	0,01	4,92
Imazapyr	0,0001	0,0005	0,01	9,08
Imidacloprid	0,0009	0,0032	0,01	6,40
Iodosulfuron-methyl-sodium	0,0043	0,0153	0,02	6,13

Sostanza attiva	LOD calc (µg/L)	LOQ calc. (µg/L)	LOQ appl. (µg/L)	CV ripetib. (%)
Ioxynil	0,0056	0,0197	0,02	7,88
Iprovalicarb (a+b)	0,0014	0,0048	0,01	9,61
Isoproturon	0,0002	0,0008	0,01	7,74
Linuron	0,0006	0,0020	0,01	7,89
MCPA	0,0038	0,0133	0,02	5,34
Mepanipyrim	0,0012	0,0041	0,01	8,21
Mesosulfuron-methyl	0,0005	0,0016	0,01	6,57
Metalaxyl	0,0003	0,0010	0,01	3,87
Metazachlor	0,0002	0,0006	0,01	6,02
Methiocarb	0,0010	0,0036	0,01	7,13
Methomyl	0,0028	0,0099	0,01	9,93
Methoxyfenozide	0,0051	0,0179	0,02	7,18
Metolachlor	0,0009	0,0033	0,01	6,58
Metribuzin	0,0028	0,0098	0,01	9,82
Metsulfuron-methyl	0,0001	0,0004	0,01	8,03
Mevinphos	0,0006	0,0021	0,01	4,29
Molinate	0,0070	0,0249	0,05	9,97
Monolinuron	0,0006	0,0022	0,01	8,65
Myclobutanil	0,0014	0,0050	0,01	10,06
Omethoate	0,0002	0,0008	0,01	7,91
Oxadixyl	0,0034	0,0119	0,02	4,75
Oxamyl	0,0023	0,0083	0,01	8,29
Oxydemeton-methyl	0,0001	0,0004	0,01	8,92
Parathion-Methyl	0,0012	0,0044	0,01	8,80
Penconazole	0,0007	0,0024	0,01	4,74
Pendimethalin	0,0070	0,0249	0,05	9,97
Phosmet	0,0009	0,0031	0,01	6,22
Picloram	0,0043	0,0153	0,02	6,11
Picoxystrobin	0,0052	0,0183	0,02	7,32
Pinoxaden	0,0002	0,0007	0,01	7,48
Pirimicarb	0,0001	0,0004	0,01	7,30
Pirimiphos-methyl	0,0008	0,0030	0,01	5,94
Prometryn	0,0003	0,0011	0,01	4,40
Propamocarb	0,0008	0,0028	0,01	5,56
Propargite	0,0058	0,0205	0,05	8,21
Propiconazole	0,0003	0,0010	0,01	9,81
Propoxur	0,0059	0,0210	0,02	8,39
Propyzamide	0,0023	0,0082	0,01	8,21
Pymetrozine	0,0006	0,0023	0,01	9,18
Pyraclostrobin	0,0013	0,0045	0,01	8,93
Pyrazophos	0,0005	0,0018	0,01	7,13
Pyrimethanil	0,0013	0,0048	0,01	9,55
Quinoxifen	0,0013	0,0047	0,01	4,69
Rimsulfuron	0,0005	0,0019	0,01	7,61
Simazine	0,0006	0,0021	0,01	8,36
Sulcotrione	0,0003	0,0009	0,01	9,19
Tebuconazole	0,0005	0,0016	0,01	6,49
Terbutylazine	0,0001	0,0004	0,01	7,72
Terbutylazine-desethyl	0,0003	0,0009	0,01	9,45
Tetraconazole	0,0023	0,0082	0,01	8,18
Thiabendazole	0,0001	0,0005	0,01	10,27
Thiacloprid	0,0001	0,0005	0,01	10,26
Thiamethoxam	0,0001	0,0005	0,01	10,15
Thiophanate Methyl	0,0026	0,0094	0,01	9,38
Triadimefon	0,0006	0,0022	0,01	8,86
Triadimenol	0,0064	0,0227	0,05	9,09
Triasulfuron	0,0002	0,0008	0,01	7,59
Triazophos	0,0013	0,0045	0,01	9,07
Tribenuron methyl	0,0004	0,0016	0,01	6,25
Trichlorfon	0,0006	0,0020	0,01	7,91
Zoxamide	0,0006	0,0020	0,01	7,92

LOD: limite di rilevazione; LOQ: limite di quantificazione; CV: coefficiente di variazione

**A10. Parte B: Detector di massa ad alta risoluzione Orbitrap
Q-Exactive Focus abbinato al LC Thermo Ultimate 3000,
iniezione diretta – concentrazione 0,1 µg/L**

Sostanza attiva	Esattezza (%)	LOD calc. (µg/L)	LOQ calc. (µg/L)	LOQ app. (µg/L)	S _r (µg/L)	CV (%)	δi (µg/L)	Ue (µg/L)
alachlor	0,9	0,00029	0,0014	0,010	0,0013	1,3	0,0027	0,0037
ametryn	1,0	0,00017	0,00087	0,010	0,00073	0,7	0,0011	0,0029
atrazine	1,4	0,00018	0,00092	0,010	0,00077	0,8	0,0018	0,0033
atrazine-desethyl	4,2	0,00040	0,0020	0,010	0,0019	1,9	0,0025	0,0050
atrazine-desisopropyl	6,2	0,00044	0,0022	0,010	0,0013	1,4	0,0022	0,0042
azinphos-ethyl	2,0	0,00051	0,0026	0,010	0,0013	1,3	0,0019	0,0037
azinphos-methyl	0,7	0,00035	0,0017	0,010	0,0014	1,4	0,0019	0,0042
chlorpyrifos	1,4	0,00098	0,0049	0,010	0,0026	2,6	0,0047	0,0070
DACT	6,2	0,00103	0,0051	0,010	0,0022	2,5	0,0035	0,0059
dimethoate	1,2	0,00015	0,00074	0,010	0,0009	0,9	0,0015	0,0031
ethoprophos	0,7	0,00017	0,0008	0,010	0,00082	0,8	0,0016	0,0030
etrimfos	0,1	0,00025	0,0013	0,010	0,0005	0,5	0,0013	0,0030
fonofos	1,6	0,00122	0,0061	0,010	0,0048	4,9	0,0070	0,011
heptenophos	1,0	0,00019	0,00097	0,010	0,00075	0,8	0,0016	0,0030
isofenphos	5,2	0,00097	0,0048	0,010	0,0045	4,7	0,0047	0,0098
malathion	13,1	0,00026	0,0013	0,010	0,0010	1,2	0,0022	0,0037
methacrifos	0,8	0,00077	0,0039	0,010	0,00095	1,0	0,0022	0,0039
methidathion	1,0	0,00016	0,00078	0,010	0,00097	1,0	0,0013	0,0036
metolachlor	0,5	0,00019	0,00097	0,010	0,0008	0,8	0,0014	0,0031
metribuzin	0,7	0,00025	0,0013	0,010	0,00038	0,4	0,00083	0,0029
mevinphos	0,2	0,00050	0,0025	0,010	0,0011	1,1	0,0021	0,0035
molinate	1,7	0,00060	0,0030	0,010	0,0017	1,6	0,0026	0,0043
oxadiazon	5,8	0,00135	0,0067	0,010	0,0033	3,5	0,0045	0,0097
pendimethalin	6,6	0,00054	0,0027	0,010	0,0033	3,5	0,0042	0,0121
phosalone	1,0	0,00048	0,0024	0,010	0,0022	2,2	0,0028	0,0075
phosphamidon	1,0	0,00025	0,0012	0,010	0,0011	1,1	0,0013	0,0034
pirimiphos-ethyl	6,2	0,00114	0,0057	0,010	0,0068	7,2	0,0076	0,0166
pirimiphos-methyl	1,4	0,00034	0,0017	0,010	0,0021	2,2	0,0026	0,0051
prometryn	0,7	0,00019	0,00097	0,010	0,00056	0,7	0,0019	0,0030
simazine	2,7	0,00013	0,00063	0,010	0,0013	1,3	0,0016	0,0036
terbutylazine	2,3	0,00034	0,0017	0,010	0,0010	1,0	0,0013	0,0033
terbutylazine-desethyl	3,9	0,00040	0,0020	0,010	0,0014	1,5	0,0021	0,0041
terbutryn	1,2	0,00029	0,0014	0,010	0,00094	1,2	0,0022	0,0033

LOD: limite di rilevazione; LOQ: limite di quantificazione; S_r: scarto tipo di ripetibilità; CV: coefficiente di variazione; δi: scarto tipo di ripetibilità intermedia (ISO 13530); Ue: incertezza estesa

A11. Condizioni operative in LC-MSMS

Esempio di alcune condizioni operative in LC-MSMS

Parametro operativo	Esempio 1	Esempio 2
Colonna	Acquity HSS T3 1,8 µm 2,1 x 100 mm o equivalente	Colonna HPLC in fase inversa del tipo C18 da 150 mm x 2,1 mm ID, granulometria 3-5 µm o equivalente
Temperatura del forno della colonna (°C)	40°C (±2°C)	40°C
Fase mobile: Eluente A	Acqua con ammonio formiato 5 mM e 0,1% di acido formico	formiato di ammonio 5 mM in acqua
Fase mobile: Eluente B	metanolo con ammonio formiato 5 mM e 0,1% di acido formico	formiato di ammonio 5 mM in metanolo
Flusso (mL/min)	0,45	175
Programmata di eluizione	Tabella seguente - gradiente UHPLC	Tabella seguente - gradiente HPLC
Volume iniettato (µL)	100	40

Esempio di gradiente UHPLC

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Flusso (mL/min)
0,00	80	20	0,45
0,60	80	20	0,45
12,60	0	100	0,45
13,60	0	100	0,45
16,00	80	20	0,45

Esempio di gradiente HPLC

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	50	50
1	50	50
20	5	95
27	5	95
27,05	50	50
36	50	50

ISS.CAA.004.REV01

BENZENE E ALTRI VOC: METODO HS-SPME E GC-MS

0. Generalità e definizioni

Il benzene fa parte dei VOC, un'ampia classe di composti caratterizzati da un'elevata tensione di vapore a temperatura ambiente.

Il benzene ha una notevole rilevanza dal punto di vista igienico-sanitario in quanto è riconosciuto come cancerogeno per la salute umana.

Il benzene è utilizzato in campo industriale e si trova nei prodotti petroliferi, in particolare, nelle benzine. La presenza del benzene nell'ecosistema acquatico è legata a perdite che si possono verificare durante le fasi di trasporto e stoccaggio dei prodotti derivati dal petrolio, oppure a scarichi industriali.

1. Campo di applicazione

Il metodo si applica alle acque destinate e da destinare al consumo umano, incluse le acque di sorgente, alle acque di piscina e a quelle utilizzate per la produzione di acque per dialisi, secondo le definizioni riportate nella normativa vigente.

Il campo di misura del metodo dipende da molte variabili strumentali e dai volumi impiegati: il metodo deve almeno permettere di quantificare concentrazioni inferiori o uguali a 0,3 µg/L, corrispondente al 30% del valore di parametro (1,0 µg/L, Allegato I – Parte B del DL.vo 31/2001) come specificato nell'Allegato II – Parte B del DM 14 giugno 2017.

È compito di ogni laboratorio verificare le prestazioni delle apparecchiature utilizzate e la compatibilità con quanto richiesto dalla normativa.

2. Principio del metodo

Il metodo permette la determinazione del benzene e di altri VOC mediante microestrazione in fase solida in spazio di testa (HS-SPME), separazione gas-cromatografica e rivelazione tramite spettrometria di massa. Un volume noto del liquido in esame è introdotto in una fiala di vetro (*vial*) con chiusura ermetica e posto in riscaldamento sotto agitazione mediante un sistema automatico di campionamento. Il benzene e gli altri VOC sono poco solubili in acqua, pertanto tendono ad occupare lo spazio di testa delle *vial*. La fibra SPME viene esposta per il campionamento dei VOC nello spazio di testa, successivamente viene desorbita nell'iniettore del GC-MS. L'identificazione avviene per confronto, con soluzioni di taratura, dei tempi di ritenzione e abbondanza dello ione target (quantificazione) e dello ione qualifier del benzene e degli altri VOC; la quantificazione si esegue per confronto tra le aree dei picchi ottenuti iniettando il campione e le aree dei picchi ottenuti dalle soluzioni di taratura.

3. Interferenze e cause di errore

La determinazione del benzene e altri VOC può essere affetta da errori in eccesso a seguito di contaminazioni introdotte durante il prelievo o la successiva manipolazione del campione. Tutto il materiale impiegato nel corso dell'analisi deve essere accuratamente lavato e trattato termicamente come descritto in (5).

È opportuno effettuare un rigoroso controllo dell'ambiente di lavoro prima dell'indagine analitica, al fine di eliminare la presenza di solventi organici contenenti VOC e di altre fonti di contaminazione.

Errori in eccesso possono essere indotti anche da effetti memoria dell'autocampionatore o del dispositivo di estrazione della fase gas. In tal caso la contaminazione deve essere eliminata lavando o flussando l'apparecchiatura utilizzata e/o analizzando ripetutamente bianchi dei reagenti fino alla totale scomparsa dei segnali attribuiti all'effetto memoria.

Per evitare il fenomeno della cross-contaminazione è possibile fare una pulizia mediante introduzione della fibra nella stazione di pulizia posta sull'autocampionatore. Analizzare successivamente un bianco fibra per confermare la pulizia della stessa.

Il prelievo e i successivi trattamenti del campione devono essere effettuati adottando gli accorgimenti descritti nei paragrafi successivi in modo da evitare perdite delle sostanze ricercate.

Al fine di migliorare la ripetibilità del procedimento analitico ed eliminare l'influenza di eventuali sostanze interferenti è preferibile fare uso di standard interno.

4. Campionamento e conservazione dei campioni

Il campionamento rappresenta una fase estremamente delicata e decisiva per tutto il procedimento analitico, perché è soprattutto in questa sede che si può verificare la perdita di analiti volatili o la contaminazione del campione.

Il benzene e gli altri VOC si ripartiscono tra fase liquida e gassosa: risulta fondamentale ridurre al minimo le perdite del composto sia durante le operazioni di campionamento che di preparazione del campione. Per questo motivo si consiglia di effettuare il prelievo direttamente nelle *vial* (5.3.) utilizzate per l'analisi strumentale. Effettuare il dosaggio del volume desiderato di campione evitando l'utilizzo di pipette (nell'aspirazione vi è presenza di spazio di testa) preferendo siringhe e prelevando il campione senza formazione di bolle o spazio di testa all'interno della siringa stessa: è possibile aggiungere nei *vial* cloruro di sodio (indicativamente 30% p/v) prima del dosaggio del campione al fine di facilitare il passaggio del benzene nello spazio di testa.

In alternativa, utilizzare bottiglie di vetro chiuse con tappo a vite inerte. Prima del riempimento è necessario avvinare bene le bottiglie con l'acqua da campionare. Non filtrare l'acqua ed evitare ogni operazione che faciliti il degasaggio dei VOC disciolti. Riempire il recipiente fino all'orlo e tappare subito evitando di lasciare spazi gassosi nei quali possano passare i composti più volatili che andrebbero perduti all'apertura del recipiente, con conseguente stima per difetto del reale contenuto degli analiti ricercati.

I campioni durante il trasporto dal luogo di prelievo al laboratorio devono essere conservati in condizioni refrigerate. Le analisi devono essere effettuate al più presto, al massimo entro 5 giorni, conservando nel frattempo il campione a temperatura refrigerata.

5. Materiali e apparecchiature

5.1. Normale attrezzatura di laboratorio

Sia la vetreria che i contenitori impiegati nel corso della determinazione devono essere sottoposti ad un trattamento preliminare in modo da rimuovere eventuali tracce di VOC.

Lavare tutta la vetreria con un detergente e risciacquarla abbondantemente con acqua (6.1.1.) e successivamente con acqua ultrapura (6.1.2). Asciugare i contenitori riscaldandoli in stufa ad una temperatura compresa tra 150°C e 200°C per almeno 2-3 ore. Conservare i contenitori in luogo esente da contaminazioni da VOC.

Al fine di evitare operazioni di pulizia che possono risultare non completamente efficienti, si consiglia l'uso di attrezzatura monouso: bottiglie, puntali, *vial* e tappi.

5.2. Bottiglie

Si consiglia l'uso di bottiglie in vetro con tappo a vite di capacità almeno pari a 100 mL.

5.3. *Vial* (flaconcini) in vetro, setti in gomma, ghiere metalliche, pinza tappatrice (se necessaria)

Per il prelievo del campione e l'analisi utilizzare *vial* in vetro scuro per spazio di testa a tenuta di gas (volume consigliato: 20 mL), con chiusura ermetica tramite ghiere metalliche e setti monouso in gomma siliconica teflonata (facendo uso di pinza stringi-ghiera), oppure tramite ghiere metalliche con chiusura a vite munite di setto in silicone/PTFE.

Per la conservazione delle soluzioni di riferimento o di lavoro utilizzare *vial* con tappi a vite e setti in gomma siliconica teflonata.

5.4. Micropipette e microsiringhe

Micropipette tarate a volume variabile e microsiringhe di vetro tarate, lavate accuratamente con metanolo (6.2) sono utilizzate per il prelievo quantitativo del campione da sottoporre ad analisi e per la preparazione delle soluzioni di riferimento. Controllare periodicamente l'esattezza e la precisione delle microsiringhe e micropipette utilizzate.

5.5. Frigorifero e congelatore

I campioni in attesa di analisi vengono conservati a temperatura refrigerata.

Le soluzioni di riferimento vengono conservate in congelatore a -20°C, o come indicato dalla ditta fornitrice.

5.6. Stufa

Stufa per il trattamento della vetreria munita di termostato capace di mantenere costante la temperatura prefissata entro l'intervallo di $\pm 20^\circ\text{C}$.

5.7. Strumentazione analitica e accessori

- (5.7.1) Sistema autocampionatore con agitatore termostato specifico per estrazione con fibre SPME.
- (5.7.2) Gascromatografo con analizzatore a spettrometria di massa.
- (5.7.3) Colonna cromatografica capillare in silice fusa specifica per l'analisi dei VOC (es. Rxi™-624Si, lunghezza 30 m, diametro 0,25 mm, spessore del film 1.4 µm). È possibile utilizzare colonne cromatografiche con caratteristiche diverse da quelle riportate purché aventi specifiche tecniche idonee per la separazione dei composti ricercati e in grado di fornire prestazioni del metodo compatibili con quelle richieste dalla normativa.
- (5.7.4) Fibra SPME rivestita con un film di Carboxen™/polidimetilsilossano PDMS (spessore 75-85 µm), o con film Divinilbenzene/Carboxen™/PDMS (spessore 30-50 µm). È possibile utilizzare fibre SPME con caratteristiche diverse da quelle riportate purché aventi specifiche tecniche idonee per l'estrazione dei composti ricercati e in grado di fornire prestazioni del metodo compatibili con quelle richieste dalla normativa.
- (5.7.5) Sistema di acquisizione ed elaborazione dati.
- (5.7.6) Gas di trasporto (elio), gas di estrazione dello spazio di testa (elio). Utilizzare gas di elevata purezza filtrati attraverso una trappola a carbone attivo ed eventualmente una a setacci molecolari; può rendersi necessaria anche l'eliminazione di tracce di ossigeno mediante opportuna trappola.

6. Reagenti e materiali di riferimento

In generale tutti i reagenti devono essere di grado analitico e con caratteristiche adatte all'analisi gascromatografica.

6.1. Acqua

Per il risciacquo preliminare della vetreria potrà essere usata (6.1.1) acqua ottenuta dalla deionizzazione o dalla distillazione di acqua potabile.

Per la preparazione dei reagenti e delle soluzioni di riferimento nonché per il risciacquo finale della vetreria dovrà essere usata acqua ultrapura esente da benzene e VOC. Quest'ultima può essere ottenuta sottoponendo l'acqua deionizzata (6.1.1.) a demineralizzazione o ridistillazione (6.1.2).

6.2. Metanolo

Utilizzare un prodotto ultrapuro dopo aver verificato l'assenza di impurezze che interferiscono con la determinazione in oggetto.

6.3. Benzene (e altri VOC)

Utilizzare polveri dei composti puri ad elevata purezza, per la preparazione delle soluzioni di taratura oppure soluzioni commerciali certificate.

Al fine di evitare fenomeni di contaminazione incrociata, è opportuno conservare tali prodotti in ambiente refrigerato, separato da quello dei campioni, al riparo dalla luce.

6.4. Standard interno

L'utilizzo di uno standard interno consente di eliminare gli errori dovuti alle fluttuazioni della quantità iniettata e alla presenza di sostanze interferenti. Affinché un determinato composto possa essere utilizzato come standard interno deve avere un comportamento chimico-fisico simile alla sostanza in esame, non essere presente nei campioni reali, essere stabile e inerte nei confronti dei composti da determinare, dare una risposta all'analizzatore impiegato, avere un tempo di ritenzione compreso nell'intervallo dei tempi di ritenzione dei composti da determinare, essere risolto gascromatograficamente rispetto alle sostanze da determinare. A causa di tali limitazioni, non è possibile individuare un'unica sostanza come standard interno per ogni tipo di campione, è necessario scegliere caso per caso il composto più idoneo a tale utilizzo. Per la determinazione del benzene si segnalano i seguenti standard interni: il trifluorobenzene ($C_6H_6F_3$), il fluorobenzene (C_6H_5F), il benzene-d6 (C_6D_6), il clorobenzene-d5 (C_6D_5Cl).

Utilizzare polveri dei composti puri ad elevata purezza, per la preparazione delle soluzioni di taratura oppure soluzioni commerciali certificate.

6.5. Soluzioni di riferimento

Nei paragrafi successivi si riportano i passaggi di diluizione per la preparazione delle soluzioni di riferimento contenenti i composti in esame (benzene e altri VOC) e gli standard interni. Le concentrazioni indicate sono a titolo esemplificativo e possono variare in funzione del titolo delle soluzioni commerciali, dell'intervallo di concentrazioni che si vuole determinare, della strumentazione analitica, della procedura di preparazione che si vuole applicare e in generale delle condizioni operative.

6.6. Soluzione primaria di riferimento di benzene (2000 mg/L)

La soluzione può essere preparata in laboratorio a partire dal composto puro. In un matraccio tarato da 100 mL, riempito con circa 50 mL di metanolo (6.2), pesare 200 mg del composto puro (6.3). Portare a volume con metanolo, omogeneizzare e conservare la soluzione al riparo dalla luce, a temperatura refrigerata; la soluzione è stabile per 12 mesi.

La soluzione primaria di riferimento può essere sostituita da una soluzione commerciale a titolo noto, certificata, contenente benzene, o una miscela di benzene e altri VOC. Le soluzioni di benzene (ed eventualmente altri VOC in miscela) devono essere conservate alla temperatura indicata dal fornitore e sono stabili per il periodo specificato dal fornitore.

6.6.1. Soluzione primaria di riferimento di standard interno (2000 mg/L)

La soluzione viene preparata in laboratorio a partire dal composto puro (6.4). In un matraccio tarato da 100 mL, riempito con circa 50 mL di metanolo (6.2), pesare 200 mg del composto scelto come standard interno. Portare a volume con metanolo, omogeneizzare e conservare la soluzione al riparo dalla luce, a temperatura refrigerata; la soluzione è stabile per 12 mesi.

La soluzione primaria di riferimento dello standard interno può essere sostituita da una soluzione commerciale a titolo noto, certificata, che deve essere conservata alla temperatura indicata dal fornitore ed è stabile per il periodo specificato dal fornitore.

6.6.2. Soluzione secondaria di riferimento di benzene (100 mg/L)

In un matraccio tarato da 10 mL, riempito con circa 5 mL di metanolo (6.2), introdurre, con una microsiringa 500 µL della soluzione (6.6.1), portare a volume con metanolo. La soluzione in metanolo a 50 mg/L conservata al riparo dalla luce e a temperatura refrigerata è stabile per 1 mese.

La soluzione secondaria di riferimento può essere preparata per diluizione della soluzione commerciale a titolo noto certificata del composto o dei composti in esame.

6.6.3. Soluzione secondaria di riferimento di standard interno (50 mg/L)

In un matraccio tarato da 10 mL, riempito con circa 5 mL di metanolo (6.2), introdurre, con una microsiringa 250 µL della soluzione (6.6.2), portare a volume con metanolo. La soluzione in metanolo a 50 mg/L conservata al riparo dalla luce e a temperatura refrigerata è stabile per 1 mese.

La soluzione secondaria di riferimento può essere preparata per diluizione della soluzione commerciale a titolo noto certificata del composto o dei composti in esame.

Si può eventualmente preparare un'altra soluzione a concentrazione intermedia.

6.6.4. Soluzione diluita per aggiunte di standard interno (5 mg/L).

Diluire la soluzione secondaria di riferimento di standard interno ad una concentrazione di 5 mg/L in metanolo, o eventualmente ad una concentrazione diversa in funzione della concentrazione iniziale, dell'intervallo della retta di taratura e delle modalità operative. In tutti i *vial* contenenti i campioni da analizzare e le soluzioni per la retta di taratura si aggiunge 1 µL di tale soluzione. La concentrazione finale di standard interno in 10 mL di acqua è 0,5 µg/L, tale concentrazione finale nel *vial* da analizzare dovrebbe essere vicina al valore limite di parametro del benzene indicato dalla normativa e compresa nell'intervallo della retta di taratura. Conservare alla temperatura di -20°C in *vial* di vetro scuro per un tempo massimo di 1 settimana.

6.6.5. Soluzioni per la retta di taratura strumentale

Dalla soluzione di standard di riferimento a 100 mg/L (6.6.2) si preparano le soluzioni diluite in metanolo, riportate in Tabella 1. Per ciascun livello di taratura, 1 µL della soluzione standard di riferimento viene aggiunto a 10 mL di acqua; si ottengono così le concentrazioni riportate nell'ultima colonna della Tabella 1. Come indicato al paragrafo 6.6.4, in tutte le *vial* viene, inoltre, aggiunto 1 µL di soluzione di standard interno (5 mg/L – soluzione 6.6.4) la cui la concentrazione finale in 10 mL di acqua è 0,5 µg/L.

Si consiglia di preparare le soluzioni di lavoro immediatamente prima dell'impiego.

Prima di preparare le soluzioni standard per la retta di taratura controllare la purezza del metanolo effettuando un'analisi di un bianco: 10 mL di acqua con aggiunto 1 µL di metanolo.

Le concentrazioni dello standard di riferimento, dello standard interno e le relative diluizioni riportate nella Tabella 1 sono a titolo esemplificativo; potranno essere utilizzate soluzioni a concentrazioni diverse.

Tabella 1. Schema di preparazione della retta di taratura

Livelli di taratura	Standard di riferimento diluiti (mg/L)	Prelievi per diluizioni (μL)	Volume di metanolo da aggiungere (μL)	Standard in 10 mL di acqua ($\mu\text{g/L}$)
8	50,0	100 μL di sol. 6.6.3 (100 mg/L)	100	5,0
7	20,0	100 μL di sol.6.6.3 (100 mg/L)	400	2,0
6	10,0	100 μL di sol.6.6.3 (100 mg/L)	900	1,0
5	5,0	100 μL di sol. livello di taratura 6 (10,0 mg/L)	100	0,5
4	2,0	100 μL sol. livello di taratura 6 (10,0 mg/L)	400	0,2
3	1,0	100 μL sol. livello di taratura 6 (10,0 mg/L)	900	0,1
2	0,5	100 μL sol. livello di taratura 3, (1,0 mg/L)	100	0,05
1	0,2	100 μL sol. livello di taratura 3 (1,0 mg/L)	400	0,02

7. Procedura di misura

7.1. Operazioni preliminari

Predisporre il sistema: autocampionatore, gascromatografo con analizzatore a spettrometria di massa, sistema di acquisizione ed elaborazione dati, al funzionamento seguendo le indicazioni descritte nei manuali forniti dalle case costruttrici, settando i parametri di lavoro in modo da ottimizzare le condizioni operative in base al dispositivo utilizzato.

7.2. Preparazione dei campioni

Nel caso il prelievo sia stato effettuato in bottiglie da 100 mL (5.2) occorre trasferire il campione negli appositi *vial* per spazio di testa/estrazione con fibra SPME. Togliere le bottiglie dal frigorifero, attendere il raggiungimento della temperatura ambiente, trasferire 10 mL di campione nel *vial* (previa aggiunta opzionale di sodio cloruro), seguendo gli accorgimenti descritti in (4), tappare immediatamente, aggiungere attraverso il setto 1 μL della soluzione per aggiunte di standard interno (6.6.4.), utizzando una microsiringa di vetro del volume di 10 μL . Il dosaggio del volume di standard interno deve essere estremamente riproducibile al fine di ottenere la medesima concentrazione in tutte le soluzioni analizzate (bianchi, standard di riferimento per taratura e controllo, campioni); si consiglia di ridurre al minimo necessario il volume di standard interno aggiunto per evitare che il solvente nel quale sono preparate le soluzioni interferisca e competa con gli analiti da determinare nella fase di adsorbimento sulla fibra SPME.

7.3. Estrazione SPME

L'estrazione SPME del benzene e altri VOC dai campioni di acqua viene eseguita con una fibra in Stableflex™/SS, rivestita con un film di Carboxen™/polidimetilsilossano PDMS (spessore 75-85 µm) installata su un autocampionatore con agitatore termostato. La fibra viene esposta nello spazio di testa del campione e sottoposta ad agitazione alla temperatura di 35°C per 15 minuti.

Successivamente alla fase di assorbimento, la fibra SPME viene immediatamente desorbita all'interno della porta di iniezione del gascromatografo, in modalità split (split ratio 5).

I principali parametri di controllo dell'autocampionatore per fibra SPME e del GC-MS sono riportati in Tabella 2; i valori sono solo a titolo esemplificativo e vengono scelti da ogni singolo laboratorio in funzione della strumentazione di cui dispone.

7.4. Taratura

Analizzare ciascuna *vial* preparata come descritto in 7.2 applicando il procedimento di seguito riportato.

Per ciascun livello di taratura si consiglia di eseguire 3 ripetizioni su tre *vial* distinte.

Si consiglia di preparare una nuova retta di taratura almeno una volta al mese e di utilizzare nuovi standard di riferimento diluiti ad ogni sessione analitica.

Dopo aver predisposto la strumentazione secondo le modalità operative prescelte, introdurre i *vial* contenenti le soluzioni di taratura nell'autocampionatore del sistema HS-SPME, seguendo l'ordine di analisi di concentrazioni crescenti, ponendo un bianco di controllo subito dopo la soluzione più concentrata al fine di valutare la possibilità di effetto memoria del sistema. Le condizioni di lavoro per l'analisi mediante spazio di testa possono essere ottimizzate in funzione della strumentazione disponibile e della matrice analizzata intervenendo su alcune variabili strumentali: in Tabella 2 sono indicate, a titolo esemplificativo, le condizioni di lavoro.

Tabella 2. Esempificazione delle condizioni operative per l'analisi mediante HS-SPME e GC-MS. I valori sono solo a titolo esemplificativo e vengono scelti da ogni singolo laboratorio in funzione della strumentazione di cui dispone

Parametro operativo	Valore/settaggio
Volume campione nel <i>vial</i>	10 mL in <i>vial</i> da 20 mL Velocità di agitazione del campione prima dell'assorbimento = 500 giri/min
Termostatazione autocampionatore	Tempo di agitazione del campione prima dell'assorbimento = 5 min Temperatura di agitazione = 35°C Tempo di assorbimento = 15 min Temperatura di assorbimento = 35°C
Gas di trasporto	He
Colonna, flusso in colonna	Colonna Sil 624: 30 m – 0,25 mm – 1,4 µm (o altra colonna); 50 mL/s
Rampa di temperatura	35°C 1 min – 10°C/min fino a 65°C – 25°C/min fino a 130°C per 1 min – 50°C/min fino a 240°C per 4,5 min
T iniettore, transferline, sorgente	280°C, 280°C, 240°C (ionizzazione a impatto elettronico)
Liner	Liner in vetro a tubo dritto, diametro interno 0,75 mm
Split ratio	5
Analizzatore	Singolo quadrupolo, in modalità di acquisizione SIM Energia di ionizzazione= 70 eV Temperatura sorgente = 240°C
Mass Range	Benzene: ioni acquisiti m/z 78, 77, 52 e 51 (Tabella 3)

Utilizzando software strumentali in dotazione è possibile effettuare la registrazione, il trattamento dei dati analitici, la costruzione delle rette di taratura, l'elaborazione dei dati dei campioni incogniti e l'emissione dei risultati in modo automatizzato.

Date le caratteristiche dinamiche della tecnica strumentale utilizzata è difficile che la risposta si mantenga costante nel tempo, pertanto è necessario verificare la validità della retta di taratura per mezzo di una o più soluzioni di controllo scelte all'interno del campo di misura, preferibilmente una alla concentrazione corrispondente al limite di quantificazione e una prossima al valore limite di parametro del benzene, inserite all'inizio e/o alla fine di ogni sequenza di campioni in analisi. Si consiglia di preparare le soluzioni per la riqualificazione della retta di taratura da standard appartenenti a un lotto diverso da quello utilizzato per le soluzioni della retta di taratura stessa. Si consiglia come criterio di accettabilità uno scostamento della concentrazione degli analiti non superiore al 25% dal valore nominale. In caso contrario procedere alla costruzione di una nuova curva di taratura e valutare le possibili cause dello scostamento rilevato.

7.5. Controllo del bianco

Ad ogni sessione di analisi è necessario controllare la qualità dell'ambiente di lavoro e dei reagenti.

Per verificare la pulizia dell'ambiente di lavoro e del sistema cromatografico (fibra, colonna, setto, iniettore), all'inizio della sequenza di analisi si effettua l'analisi di 2 bianchi fibra, introducendo la fibra in una *vial* vuota.

Per controllare la purezza dei reagenti, prima dell'analisi degli standard di controllo e dei campioni incogniti, si esegue l'analisi di un bianco acqua, sottoponendo 10 mL di acqua ultrapura (6.1.2) all'intero processo analitico nelle stesse condizioni sperimentali adottate durante l'analisi dei campioni e delle soluzioni di lavoro. Se le concentrazioni del benzene o di altri composti volatili nel bianco sono superiori al limite di quantificazione, è necessario individuare ed eliminare la causa di contaminazione prima di riprendere le determinazioni analitiche.

Allo stesso modo deve essere verificato che, dopo l'analisi di soluzioni di standard, la concentrazione degli analiti determinata su un campione di acqua ultrapura sia inferiore al limite di quantificazione, al fine di escludere possibili fenomeni di trascinamento ed effetto memoria.

7.6. Dosaggio del campione

Eeguire l'analisi dei campioni seguendo la procedura (7.2) e applicando le stesse condizioni operative utilizzate per la costruzione delle rette di taratura.

Identificare il benzene e gli altri VOC eventualmente presenti nel campione sia tramite confronto dei tempi di ritenzione dei picchi cromatografici del campione con quelli delle soluzioni di taratura (si consiglia un range di oscillazione di $\pm 0,2\%$ dei tempi di ritenzione), sia tramite rapporto percentuale degli ioni acquisiti caratteristici (*Target* e *Qualifier*) riportati in Tabella 3 (si consiglia una tolleranza massima del 20%).

Misurare le aree dei picchi degli analiti e dello standard interno in modalità SIM.

Tabella 3. Rapporti m/z utilizzati per la quantificazione degli analiti (Ioni Target) e la loro conferma/identificazione (Ioni Qualifier)

Parametro	Ione Target (m/z)	Ione Qualifier (m/z)	Standard interno corrispondente	Ione Target dello Standard interno (m/z)
Benzene	52	78	fluorobenzene	96
Toluene	91	92	fluorobenzene	96
Etilbenzene	91	106	clorobenzene-d5	117
m+p-Xilene	91	106	clorobenzene-d5	117
o-Xilene	91	106	clorobenzene-d5	117

8. Calcolo ed espressione dei risultati

8.1. Calcolo della concentrazione

Dai valori delle aree dei picchi cromatografici calcolare la concentrazione dei composti identificati utilizzando le rette di taratura (7.4).

Accertarsi che la concentrazione del campione cada all'interno dell'intervallo di taratura. Qualora le concentrazioni degli analiti risultino superiori a tale intervallo, si procede all'analisi del campione diluito.

8.2. Espressione dei risultati

La concentrazione del benzene o di altri VOC nel campione va espressa in accordo con la normativa vigente.

9. Prestazioni del metodo

Il LOD è stato valutato da un singolo laboratorio mediante il calcolo dallo scarto tipo dei residui ricavato dall'elaborazione statistica della retta di taratura; a questo scopo è stata studiata una retta su 7 punti, in un intervallo di concentrazione compreso tra 0,05-5,0 µg/L.

Il LOQ è stato valutato da prove di ripetibilità effettuate da un singolo laboratorio mediante aggiunta di standard certificato ad un campione bianco alla concentrazione di 0,1 µg/L.

I valori di LOD e LOQ calcolati sono riportati a titolo di esempio in Tabella 4.

Per il benzene il limite di rilevabilità determinato (0,03 µg/L) corrisponde al 3% del valore limite di parametro (1,0 µg/L, fissato dal DL.vo 31/2001) e il limite di quantificazione corrisponde al 10% del valore limite di parametro; questi valori rispettano le specifiche richieste dal DL.vo 31/2001 (25% del valore limite di parametro) e dalla Direttiva 2015/1787/UE (30% del valore limite di parametro).

Tabella 4. Esempio di LOD e LOQ determinati sperimentalmente

Limiti	Benzene (µg/L)	Toluene (µg/L)	Etilbenzene (µg/L)	m+p-Xilene (µg/L)	o-Xilene (µg/L)
LOD	0,03	0,05	0,08	0,06	0,06
LOQ	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Lo studio di validazione è stato condotto utilizzando i risultati ottenuti da 6 laboratori nell'ambito della partecipazione a 3 confronti inter-laboratorio organizzati da Unichim nel periodo 2014-16. Per ogni confronto sono stati elaborati da un minimo di 1 a un massimo di 4 valori per ogni laboratorio e da un minimo di 13 a un massimo di 16 valori totali. I diversi laboratori hanno tutti utilizzato la tecnica GC-MS per l'identificazione e quantificazione degli analiti, ma hanno impiegato sistemi diversi per l'introduzione del campione (Purge&Trap, HS e HS-SPME).

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata in ambiente Minitab 16.

In Tabella 5 per ogni analita sono riportati i valori assegnati dei confronti (C1-C2-C3), il valore medio ottenuto da tutti i laboratori, il recupero% (come espressione dell'esattezza), la ripetibilità stretta, espressa come deviazione standard (STDr) e CVr%, la ripetibilità intermedia mediata su tutti i laboratori (STDint e CVint%), l'incertezza composta valutata come composizione matematica tra la ripetibilità intermedia e la riproducibilità, l'incertezza estesa e l'incertezza estesa percentuale.

Tabella 5. Caratteristiche di prestazione del metodo ricavate dalla partecipazione a confronti interlaboratorio

Parametro	N. cfr	Valore ($\mu\text{g/L}$)		R%	STDr	CVr%	STD int	CV int%	Uc	Ue	Ue%
		assegnato	medio								
Benzene	C1	0,560	0,540	96	0,044	8	0,032	6	0,072	0,144	27
Benzene	C2	0,662	0,629	95	0,046	7	0,030	5	0,039	0,078	12
Benzene	C3	0,918	0,841	92	0,066	8	0,034	4	0,052	0,104	12
Toluene	C1	0,820	0,861	105	0,108	13	0,041	5	0,18	0,36	42
Toluene	C2	1,48	1,486	100	0,169	11	0,149	10	0,28	0,56	38
Toluene	C3	1,96	1,934	99	0,060	3	0,067	4	0,080	0,160	27
Etil-Benzene	C1	0,57	0,569	100	0,126	22	0,064	11	0,064	0,13	22
Etil-Benzene	C2	1,15	1,14	99	0,104	9	0,135	12	0,17	0,34	30
Etil-Benzene	C3	1,62	1,72	106	0,165	10	0,095	6	0,29	0,58	34
Stirene	C1	1,08	1,12	104	0,089	8	0,087	8	0,087	0,174	16
Stirene	C2	1,25	1,19	95	0,082	7	0,062	5	0,067	0,134	11
Stirene	C3	1,70	1,70	100	0,094	6	0,097	6	/	/	/
m+p-Xilene	C1	3,07	3,30	107	0,418	13	0,254	8	0,558	1,116	34
m+p-Xilene	C2	1,26	1,29	102	0,146	11	0,072	6	0,254	0,508	39
m+p-Xilene	C3	1,50	1,66	110	0,238	14	0,136	8	0,137	0,274	17
o-Xilene	C1	1,18	1,20	102	0,064	5	0,084	7	0,0949	0,19	16
o-Xilene	C2	1,15	1,12	97	0,057	5	0,048	4	0,0480	0,096	8
o-Xilene	C3	1,26	1,35	107	0,103	8	0,063	5	0,0632	0,126	9

R%= recupero %

STDr=deviazione standard (ripetibilità stretta)

CVr%= Coefficiente di variazione %(ripetibilità stretta)

STD int= deviazione standard (ripetibilità intermedia)

CVr%= Coefficiente di variazione %(ripetibilità intermedia)

Uc= incertezza composta

Ue= incertezza estesa

Ue%= incertezza estesa %

Il valore assegnato del benzene per il confronto 3 (0,918 $\mu\text{g/L}$) è prossimo al valore limite di parametro definito dal DL.vo 31/2001 (1,0 $\mu\text{g/L}$).

Le caratteristiche di prestazione del metodo (limite di quantificazione, esattezza, precisione e incertezza) stimate al valore di parametro e ad altri livelli di concentrazione, soddisfano i requisiti riportati nel punto 2.1 allegato III del DL.vo 31/2001 e nella Direttiva 2015/1787/UE (recepita dal DM 14 giugno 2017).

Il recupero è compreso tra 90 e 111%, il CV% è sempre inferiore al 25% e l'incertezza estesa% (Ue%) è inferiore al 40%.

I laboratori di prova possono pertanto utilizzare tali valori come orientativi a scopo di verifica delle propria competenza nell'applicazione del metodo e dimostrando che rientrano sempre nei limiti indicati dal DL.vo 31/2001 e dalla Direttiva 2015/1787/UE (recepita dal Decreto 14 giugno 2017), come riportati nella sinossi specifica del metodo alla sezione "Caratteristiche di prestazione dei metodi".

Bibliografia

- American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th ed. Washington, DC: APHA; 2005.
- APAT/IRSA-CNR. *Metodi Analitici per le Acque. 29/2003, 5140: Solventi organici aromatici (spazio di testa statico +GC-FID; spazio di testa dinamico+GC-FID)*. Roma: APAT/IRSA-CNR; 2003.
- Europa. Direttiva (UE) 2015/1787 della Commissione del 6 ottobre 2015 recante modifica degli allegati II e III della direttiva 98/83/CE del Consiglio concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 260/6, 7.10.2015.
- ISO 17943:2016. Determination of volatile organic compounds in water- Method using headspace solid-phase micro-extraction (HS-SPME) followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Geneva: International Organization for Standardization; 2016.
- Italia. Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della Direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 52, 3 marzo 2001.
- Italia. Decreto Ministeriale 14 giugno 2017. Controllo e analisi delle acque potabili – Recepimento direttiva 2015/1787/UE .- Modifica degli allegati II e III del DL.vo 2 febbraio 2001, n. 31. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 192, 18 agosto 2017.
- Kolbe B, Ettre LS. *Static headspace gas-chromatography, theory and practice*. Second Edition. New York: Wiley; 2006.
- U.S. Environmental Protection Agency. *Method 8270E Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry*. Washington, DC: Environmental Protection Agency; 2017.

ISS.CAB.039.REV01**BENZO[A]PIRENE E IPA: METODO SPME-GC-MS****0. Generalità e definizioni**

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) costituiscono un'ampia classe di composti organici, contenenti due o più anelli aromatici fusi, che si formano durante la combustione incompleta e la pirolisi di materiali organici. La fonte principale di un'eventuale contaminazione da IPA delle acque destinate al consumo umano è costituita dai rivestimenti a base di catrame delle tubazioni per la distribuzione dell'acqua.

Il campo di misura del metodo dipende da molte variabili strumentali e dai volumi impiegati: il metodo deve almeno permettere di quantificare concentrazioni di Benzo[a]pirene inferiori o uguali a 0,003 µg/L, corrispondente al 30% del valore di parametro (Valore di parametro: 0,010 µg/L, come definito nell'Allegato I – Parte B del DL.vo 31/2001) come specificato nell'Allegato II – Parte B del DM 14 giugno 2017.

È compito di ogni laboratorio verificare le prestazioni delle apparecchiature utilizzate e la compatibilità con quanto richiesto dalla normativa.

L'analisi dei campioni viene effettuata mediante microestrazione in fase solida (SPME) in immersione diretta e determinazione in GC-MS in modalità selected ion monitoring (SIM).

Vari IPA sono stati classificati dalla IARC (1987) come “probabilmente” o “possibilmente” cancerogeni per l'uomo. Tra quelli comunemente presenti nelle matrici ambientali, vi sono, oltre a quattro IPA la cui determinazione è richiesta dalla normativa (BaP, BbFA, BkFA e IP), anche il BaA, il B_jFA e il DBa_hA (Tabella 1).

Tabella 1. IPA a cui è applicabile il metodo

Nominativo	Abbreviazione
Naftalene	Naf
Acenafilene	Acftl
Acenaftene	Acftn
Fluorene	Fl
Fenantrene	Fen
Antracene	Ant
Fluorantene	Flt
Pirene	Pir
Benzo(a)antracene	BaA
Benzo(b)fluorantene	BbFA
Benzo(j)fluorantene	BjFA
Benzo(k)fluorantene	BkFA
Benzo(a)pirene	BaP
Indeno(1,2,3-cd)pirene	IP
Dibenz(a,h)antracene	DBa _h A
Benzo(ghi)perilene	BghiP

0.1. Definizioni

- (0.1.1) Soluzione concentrata di standard interno: per l'analisi in GC-MS, al fine dell'identificazione e quantificazione dei composti ricercati, viene aggiunta a ciascun campione una soluzione di standard interno costituita da una miscela di IPA deuterati che

corrispondono ad ogni famiglia di anelli condensati. Si può utilizzare ad esempio una soluzione contenente (Tabella 1): naftalene-d8, acenaftene-d10, fenantrene-d10, pirene-d10, crisene-d12, perilene-d12;

- (0.1.2) Soluzione concentrata di standard di riferimento costituita da una miscela di IPA; con il presente metodo possono essere determinati i seguenti IPA: Naftalene, Acenaftilene, Acenaftene, Fluorene, Fenantrene, Antracene, Fluorantene, Pirene, Benzo[a]antracene, Crisene, Benzo[b]fluorantene, Benzo[k]fluorantene, Benzo[a]pirene, Indeno[1,2,3-c,d]pirene, Dibenz[a,h]antracene, Benzo[g,h,i]terilene;
- (0.1.3) Campioni reali. Campioni di acque dolci naturali e destinate al consumo umano (superficiali, sotterranee, potabili e minerali) prelevati sul campo nel corso dell'indagine.

1. Campo di applicazione

Il metodo si applica alle acque da destinare e destinate al consumo umano, incluse le acque di sorgente, alle acque di piscina e a quelle utilizzate per la produzione di acque per dialisi, secondo le definizioni riportate nelle normative vigenti.

In particolare, il metodo è applicabile agli IPA richiesti dalla normativa vigente e agli altri IPA riportati in Tabella 1. Esso consente di rivelare concentrazioni di singoli IPA comprese almeno nell'intervallo tra 0,003 µg/L (limite di quantificazione del BaP richiesto dalla normativa) e 0,100 µg/L.

2. Principio del metodo

L'estrazione degli IPA dalla matrice acquosa è eseguita mediante microestrazione in fase solida SPME (*Solid Phase Micro-Extraction*). Una fibra di silice fusa ricoperta di un adatto adsorbente (polidimetilsilossano - PDMS di 7 µm o 30 µm) viene immersa per un tempo prefissato e sotto continua agitazione in una soluzione acquosa neutra.

Il polimero ricoprente la fibra è in grado di estrarre gli analiti di interesse. Il successivo desorbimento termico della fibra, all'interno di un iniettore di un gascromatografo abbinato alla spettrometria di massa (GC-MS), favorisce il rilascio degli IPA adsorbiti, la loro successiva separazione su colonna cromatografica capillare, l'identificazione e la quantificazione mediante la misura dell'intensità dello ione più abbondante, acquisito in modalità SIM (acquisizione per singolo ione).

La misura dell'intensità dello ione molecolare è correlata alla concentrazione dell'IPA identificato.

3. Interferenze e cause di errore

Il mancato utilizzo di solventi, tubi, cartucce e raccordi in PET o PE, minimizza l'apporto di contaminanti di natura sistematica. Picchi interferenti possono provenire dal rilascio della fase ricoprente la fibra. I tracciati di un bianco di fibra in Polidimetilsilossano (PDMS), presentano un fondo di rilascio pronunciato a temperature operative superiori ai 250°C determinati da picchi di u.m.a. 73, 147, 281, 355, 429. Questo rilascio è meno pronunciato nelle fibre da 7 µm rispetto a

quelle da 30 µm. Come accade per le fasi stazionarie disponibili per cromatografia liquida o gassosa, le proprietà possono variare da batch a batch e/o dopo un prolungato utilizzo.

Ulteriori picchi interferenti possono provenire da sostanze fenoliche dovute ai tappi delle *vial* di campionamento (picchi base di 213 e 228 u.m.a), da ftalati (picchi di u.m.a. 149, 167), oltre ai picchi dovuti alla frantumazione progressiva del setto particolarmente sollecitato dall'ago della siringa SPME (ioni 281-299-355-429 u.m.a.).

Gli apporti di tutti questi possibili interferenti sono minimizzati dal tipo di acquisizione in SIM e controllati mediante analisi di un bianco per ogni sessione di analisi.

Adsorbimenti degli IPA pesanti su liner non-deattivati e soprattutto su ferrule in grafite, sono piuttosto frequenti e producono sottostime di campioni contenenti piccole quantità dei principi ricercati. Altra fonte di interferenza è dovuta dall'accumulo di sostanze poco volatili (idrocarburi pesanti, grassi) nei primi 5-10 cm di colonna.

Per ovviare a queste ulteriori interferenze si utilizzano liner deattivati, ferrule in vespel-grafite e colonne con temperature max operative > 350°C. Sotto queste condizioni l'influenza degli adsorbimenti viene minimizzata, e l'accumulo di sostanze poco volatili del tutto evitato, in quanto è possibile impostare programmi di temperatura del forno con temperature finali sufficientemente elevate (>330°C).

3.1. Conservazione dei materiali di riferimento

I materiali di riferimento puri e in soluzione, così come le miscele di riferimento sia concentrate che diluite, devono essere conservati in frigorifero.

4. Campionamento e conservazione dei campioni

Nel caso l'acqua sia stata clorata, aggiungere 100 mg di tiosolfato di sodio e mescolare bene. Conservare la bottiglia al buio in ghiaccio o in frigorifero alla temperatura di 1-10°C, fino all'estrazione che deve comunque avvenire entro 7 giorni dal prelievo.

5. Materiali e apparecchiature

5.1. Attrezzatura comune di laboratorio

Utilizzare vetreria comune e tarata di classe A. Al fine di evitare operazioni di pulizia che possono risultare non completamente efficienti, si consiglia l'uso di attrezzatura monouso: bottiglie per il prelievo dei campioni, puntali, *vial* e tappi.

5.2. *Vial* (flaconcini) in vetro, setti in gomma, ghiere metalliche, pinza tappatrice (se necessaria)

Per il prelievo del campione e l'analisi utilizzare *vial* in vetro scuro (volume consigliato: 20 mL) con chiusura ermetica, si possono usare ghiere metalliche e setti monouso in gomma siliconica teflonata, con pinza stringi-ghiera, oppure ghiere metalliche con chiusura a vite e setto in silicone/PTFE.

Per la conservazione delle soluzioni di riferimento o di lavoro utilizzare *vial* con tappi a vite e setti in gomma siliconica teflonata.

5.3. Micropipette e microsiringhe

Micropipette tarate a volume fisso e variabile e microsiringhe di vetro tarate, lavate accuratamente con metanolo (6.2) sono utilizzate per il prelievo quantitativo del campione da sottoporre ad analisi e per la preparazione delle soluzioni di riferimento.

5.4. Frigorifero e congelatore

I campioni in attesa di analisi vengono conservati a temperatura refrigerata.
Le soluzioni di riferimento vengono conservate alla temperatura indicata dalla ditta fornitrice.

5.5. Strumentazione analitica e accessori

- (5.5.1) Sistema autocampionatore con agitatore termostato e stazione di pulizia specifico per estrazione con fibre SPME;
- (5.5.2) Gascromatografo con analizzatore a spettrometria di massa;
- (5.5.3) Colonna cromatografia capillare, ad esempio Supelco SLB™-5MS. Fase stazionaria silfenilene polimero, con una polarità equivalente al poli(5% difenil 95% dimetil silossano); lunghezza 10 m; diametro 0,1 mm; spessore del film 0,1 µm. È possibile utilizzare colonne cromatografiche con caratteristiche diverse da quelle riportate purché aventi specifiche tecniche idonee per la separazione dei composti ricercati e in grado di fornire prestazioni del metodo compatibili con quelle richieste dalla normativa;
- (5.5.4) Fibra SPME in silice fusa, rivestita con un film di polidimetilsilossano (PDMS) (spessore 7µm o 30 µm). È possibile utilizzare fibre SPME con caratteristiche diverse da quelle riportate purché aventi specifiche tecniche idonee per l'estrazione dei composti ricercati e in grado di fornire prestazioni del metodo compatibili con quelle richieste dalla normativa;
- (5.5.5) Sistema di acquisizione ed elaborazione dati;
- (5.5.6) Gas di trasporto: elio. Utilizzare gas di elevata purezza filtrati attraverso una trappola a carbone attivo ed eventualmente una a setacci molecolari; può rendersi necessaria anche l'eliminazione di tracce di ossigeno mediante opportuna trappola.

6. Reagenti e materiali di riferimento

In generale tutti i reagenti devono essere di grado analitico e con caratteristiche adatte all'analisi gascromatografica.

Tutti i materiali di riferimento devono avere purezza o concentrazione certificate.

La purezza dei prodotti per le prove deve essere tale affinché l'analisi del bianco-reagenti soddisfi i criteri riportati in 7.1.

6.1. Acqua

- (6.1.1) Per il risciacquo preliminare della vetreria potrà essere usata acqua ottenuta dalla deionizzazione o dalla distillazione di acqua potabile;
- (6.1.2) Per la preparazione dei reagenti e delle soluzioni di riferimento nonché per il risciacquo finale della vetreria eventualmente utilizzata, dovrà essere usata acqua ultrapura. Quest'ultima può essere ottenuta sottoponendo l'acqua deionizzata (6.1.1.) a demineralizzazione o ridistillazione, mediante sistema Milli-Q.

6.2. Metanolo

Utilizzare un prodotto ultrapuro dopo aver verificato l'assenza di impurezze che interferiscono con la determinazione in oggetto.

6.3. Acetone

Utilizzare un prodotto ultrapuro dopo aver verificato l'assenza di impurezze che interferiscono con la determinazione in oggetto (esempio: Acetone per analisi purezza minimo 99%).

6.4. IPA

Utilizzare soluzioni commerciali certificate contenenti i singoli composti o i composti da ricercare in miscela.

Al fine di evitare fenomeni di contaminazione incrociata, è opportuno conservare tali prodotti in ambiente refrigerato, separato da quello dei campioni, al riparo dalla luce.

6.5. Standard interno (IS)

L'utilizzo di uno standard interno consente di eliminare gli errori dovuti alle fluttuazioni della quantità iniettata e alla presenza di sostanze interferenti. Affinché un determinato composto possa essere utilizzato come standard interno deve avere un comportamento chimico-fisico simile alla sostanza in esame, non essere presente nei campioni reali, essere stabile e inerte nei confronti dei composti da determinare, dare una risposta all'analizzatore impiegato, avere un tempo di ritenzione compreso nell'intervallo dei tempi di ritenzione dei composti da determinare, essere risolto gascromatograficamente rispetto alle sostanze da determinare. A causa di tali limitazioni, non è possibile individuare un'unica sostanza come standard interno per ogni tipo di campione, è necessario scegliere caso per caso il composto più idoneo a tale utilizzo. Per la determinazione degli IPA si segnalano i seguenti standard interni: naftalene-d8, acenaftene-d10, fenantrene-d10, pirene-d10, crisene-d12, perilene-d12 (eventualmente anche Benzo(a)pirene deuterato, Dibenzo(a,h)antracene Deuterato).

Per la preparazione delle soluzioni di taratura utilizzare soluzioni commerciali certificate.

6.6. Soluzioni di riferimento

Nei paragrafi successivi si riportano i passaggi di diluizione per la preparazione delle soluzioni di riferimento contenenti i composti in esame e gli standard interni. Le concentrazioni indicate

sono a titolo esemplificativo e possono variare in funzione del titolo delle soluzioni commerciali, dell'intervallo di concentrazioni che si vuole determinare, della strumentazione analitica, della procedura di preparazione che si vuole applicare e in generale delle condizioni operative.

6.6.1. Soluzione primaria di riferimento di IPA (100 mg/L)

La soluzione primaria di riferimento di IPA è costituita da una miscela di Naftalene, Acenaftilene, Acenaftene, Fluorene, Fenantrene, Antracene, Fluorantene, Pirene, Benzo[a]antracene, Crisene, Benzo[b]fluorantene, Benzo[k]fluorantene, Benzo[a]pirene, Indeno[1,2,3-c,d]pirene, Dibenzo[a,h]antracene, Benzo[g,h,i]perilene) alla concentrazione di 100 µg/mL in diclorometano. Conservare le fiale chiuse alla temperatura di -20°C. Dopo l'apertura lo standard viene travasato in una *vial* di vetro scuro e può essere conservato al massimo 6 mesi a -20°C.

6.6.2. Soluzione primaria di riferimento di standard interno (500 mg/L)

La soluzione primaria di riferimento di standard interno è costituita da una miscela di IPA deuterati (naftalene-d8, acenaftene-d10, fenantrene-d10, pirene-d10, crisene-d12, perilene-d12) alla concentrazione di 500 µg/mL in acetone. Conservare le fiale chiuse alla temperatura di -20°C. Dopo l'apertura lo standard viene travasato in una *vial* di vetro scuro e può essere conservato al massimo 6 mesi a -20°C.

6.6.3. Soluzione secondaria di riferimento di una miscela di IPA (20 mg/L)

La soluzione secondaria di riferimento può essere preparata per diluizione della soluzione commerciale a titolo noto certificata dei composti in esame. Diluire di 5 volte la soluzione concentrata di standard di riferimento (6.6.1) (100 mg/L) in acetone. Conservare alla temperatura di -20°C in una *vial* di vetro scuro per un tempo massimo di 2 mesi.

6.6.4. Soluzione secondaria di riferimento di standard interno (25 mg/L)

La soluzione secondaria di riferimento di standard interno può essere preparata per diluizione della soluzione commerciale a titolo noto certificata dei composti in esame. Diluire di 20 volte la soluzione concentrata di standard interno (6.6.2) (500 mg/L) in acetone. Conservare alla temperatura di -20°C in una *vial* di vetro scuro per un tempo massimo di 2 mesi.

Si può eventualmente preparare un'altra soluzione a concentrazione intermedia.

6.6.5. Soluzione diluita per aggiunte di standard interno (0,25 mg/L)

Diluire la soluzione secondaria di riferimento di standard interno (6.6.3) di 100 volte ad una concentrazione di 0,25 mg/L in acetone, o eventualmente ad una concentrazione diversa in funzione della concentrazione iniziale, dell'intervallo della retta di taratura e delle modalità operative.

In tutti i *vial* contenenti i campioni da analizzare e le soluzioni per la retta di taratura si aggiunge 1 µL di tale soluzione. La concentrazione finale di standard interno in 20 mL di acqua è 0,0125 µg/L, tale concentrazione finale nel *vial* da analizzare dovrebbe essere vicina al valore limite di parametro del Benzo[a]pirene indicato dalla normativa e compresa nell'intervallo della retta di taratura. Conservare alla temperatura di -20°C in *vial* di vetro scuro per un tempo massimo di 1 settimana.

6.6.6. Soluzioni per la retta di taratura strumentale

Dalla soluzione secondaria di riferimento di una miscela di IPA (20 mg/L) (6.6.3) si preparano le soluzioni diluite in metanolo, riportate in Tabella 2. Per ciascun livello di taratura, 1 µL della soluzione standard di riferimento viene aggiunto a 20 mL di acqua; si ottengono così le concentrazioni riportate nell'ultima colonna della Tabella 2. Come indicato al paragrafo 6.6.5, in tutte le *vial* viene, inoltre, aggiunto 1 µL di soluzione di standard interno (0,25 mg/L – soluzione 6.6.5) la cui la concentrazione finale in 20 mL di acqua è 0,0125 µg/L.

Si consiglia di preparare le soluzioni di lavoro immediatamente prima dell'impiego.

Prima di preparare le soluzioni standard per la retta di taratura controllare la purezza dell'acetone effettuando un'analisi di un bianco: 20 mL di acqua con aggiunto 1 µL di acetone.

Si consiglia di eseguire 3 ripetizioni su tre *vial* distinte per ogni livello di taratura, e di preparare una nuova retta di taratura almeno una volta al mese. Le concentrazioni dello standard di riferimento, dello standard interno e le relative diluizioni riportate nella Tabella 2 sono a titolo esemplificativo; potranno essere utilizzate soluzioni a concentrazioni diverse.

Tabella 2. Schema di preparazione della retta di taratura

Livelli di taratura	Standard di riferimento diluiti (µg/mL)	Prelievi per le diluizioni (µL)	Volume di acetone da aggiungere (µL)	Standard in 20 mL di acqua (µg/L)
8	2,00	100 µL sol. 6.6.3 (20 µg/mL)	900	0,100
7	1,00	100 µL sol. <i>livello di taratura 8</i> (2,00 µg/mL)	100	0,050
6	0,50	100 µL sol. <i>livello di taratura 8</i> (2,00 µg/mL)	300	0,025
5	0,20	100 µL sol. <i>livello di taratura 8</i> (2,00 µg/mL)	900	0,010
4	0,10	100 µL sol. <i>livello di taratura 5</i> (0,2 µg/mL)	100	0,005
3	0,05	100 µL sol. <i>livello di taratura 5</i> (0,2 µg/mL)	300	0,0025
2	0,02	100 µL sol. <i>livello di taratura 5</i> (0,2 µg/mL)	900	0,0010
1	0,01	100 µL sol. <i>livello di taratura 2</i> (0,02 µg/mL)	100	0,0005

6.6.7. Soluzioni di tuning

Standard Tuning Perfluorotributylamine GC-MS Calibration Standard 99,0%.

6.6.8. Soluzioni primaria di riferimento per la preparazione dei controlli della retta di taratura (ICV)

La Soluzione concentrata di standard di riferimento per la preparazione del controllo della retta di taratura (Initial Calibration Verification) è costituita da una miscela di IPA, appartenente a un lotto indipendente da quello utilizzato per la preparazione delle soluzioni per la retta di taratura. Può essere scelto sia uno standard di un fornitore diverso, sia uno standard del medesimo fornitore, ma di un lotto diverso. Conservare le fiale chiuse in congelatore a -20°C. Dopo l'apertura lo standard viene travasato in una *vial* di vetro scuro e può essere conservato al massimo 6 mesi in congelatore a -20°C.

Il controllo della retta di taratura viene effettuato a due livelli di concentrazione: uno corrispondente alla concentrazione del limite di quantificazione (ICV1) (0,0025 µg/L) e uno corrispondente alla concentrazione del valore limite di parametro per il Benzo[a]pirene (ICV2) (0,010 µg/L).

6.6.9. Soluzioni primaria di riferimento per la preparazione dei controlli della retta di taratura – ICV1

ICV1 diluire la soluzione 6.6.8 in acetone alla concentrazione di 0,05 µg/mL. Aggiungere a 20 mL di acqua milliQ 1 µL di soluzione di standard ICV1 e 1 µL di soluzione diluita per aggiunte di standard interno (6.6.5). La concentrazione in 20 mL di acqua risulta essere 0,0025 µg/L.

6.6.10. Soluzioni primaria di riferimento per la preparazione dei controlli della retta di taratura – ICV2

ICV2 Initial Calibration Verification diluire la soluzione 6.6.8 in acetone alla concentrazione di 0,20 µg/mL. Aggiungere a 20 mL di acqua milliQ 1 µL di soluzione di standard ICV2 e 1 µL di soluzione diluita per aggiunte di standard interno (6.6.5). La concentrazione in 20 mL di acqua risulta essere 0,010 µg/L.

Le soluzioni a 0,20 e 0,05 µg/mL possono essere conservate in una *vial* di vetro scuro, per una settimana, in congelatore a -20°C.

6.6.11. Soluzioni primaria di riferimento per la preparazione del Matrix Spike

Diluire la soluzione secondaria di riferimento (6.6.3) (20 mg/L) alla concentrazione di 0,20 µg/mL. Preparare due campioni con 20 mL di acqua di rete (Matrix Spike, MaSp: MaSp 1 e MaSp 2) aggiungendo in ciascuno 1 µL di soluzione di standard alla concentrazione di 0,20 µg/mL e 1 µL di soluzione diluita per aggiunte di standard interno (6.6.5). La concentrazione in 20 mL di acqua risulta essere 0,010 µg/L.

La soluzione a 0,20 µg/mL può essere conservate in una *vial* di vetro scuro, per una settimana, in congelatore a -20°C.

6.6.12. Soluzioni primaria di riferimento per la preparazione di un campione di controllo

Diluire la soluzione diluita di stoccaggio di standard di riferimento (6.6.3) (20 mg/L) alla concentrazione di 0,20 µg/mL. Aggiungere a 20 mL di acqua milliQ 1 µL di soluzione di standard alla concentrazione di 0,20 µg/mL e 1 µL di soluzione diluita per aggiunte di standard interno (6.6.5). La concentrazione in 20 mL di acqua risulta essere 0,010 µg/L.

La soluzione a 0,20 µg/mL può essere conservate in una *vial* di vetro scuro, per una settimana, in congelatore a -20°C.

7. Controllo di processo

Giornalmente, in ogni sessione analitica, devono essere effettuate alcune verifiche relativamente all'operatività della strumentazione e allo stato di preparazione e conservazione delle soluzioni impiegate nell'analisi.

7.1. Controllo dei bianchi

Si effettua l'analisi di 2 bianchi "fibra" e un bianco "acqua MilliQ" per verificare la pulizia del sistema cromatografico (fibra, colonna, setto, iniettore) e dei reagenti (acqua MilliQ, gas) utilizzati per l'analisi. L'analisi del bianco "acqua MilliQ" non deve mostrare alcun segnale superiore a 0,001 µg/L che corrisponde ad 1/3 del più basso limite di quantificazione.

7.2. Controllo della colonna cromatografia

Si effettua il calcolo della risoluzione della coppia critica Benzo(b)fluorantene e Benzo(k)fluorantene per la verifica delle prestazioni della colonna sul campione di controllo a 10,0 ng/L. La risoluzione deve essere superiore al 50%.

7.3. Controllo della curva di taratura

Si effettua l'analisi di due campioni di acqua Milli Q addizionati di soluzioni standard di IPA alle concentrazioni finali di 2,5 e 10,0 ng/L di d-IPA a 12,5 ng/L, ICV1 e ICV2 corrispondenti rispettivamente al limite di quantificazione e al limite di legge. Le concentrazioni degli standard ICV1 e ICV2 devono essere compresi in un range di $\pm 20\%$ della concentrazione attesa per IPA a 2 o 3 anelli e in un range di $\pm 25\%$ della concentrazione attesa per IPA a 4 o più anelli. Le soluzioni standard di controllo vengono ripetute alternativamente ogni 10 campioni.

7.4. Analisi in doppio di un campione reale (MaSp)

Può essere scelto un campione di acqua potabile non contaminato al quale viene aggiunta una soluzione standard di IPA alla concentrazione finale di 10 ng/L; si utilizzano gli standard provenienti dallo stesso lotto impiegato per la costruzione della retta di taratura. Il campione viene preparato e analizzato in duplicato; si calcola la differenza tra le concentrazioni ottenute per i due campioni MaSp 1 e MaSp 2, che deve risultare inferiore al limite di ripetibilità ottenuto in sede di validazione.

7.5. Analisi di un campione di controllo

Può essere impiegato un campione di acqua Milli-Q al quale viene aggiunta una soluzione standard di IPA alla concentrazione finale di 10 ng/L; si utilizzano gli standard provenienti dallo stesso lotto impiegato per la costruzione della retta di taratura. In alternativa, quando disponibile, il laboratorio può decidere di utilizzare con una frequenza minore (es. ogni 2 mesi) una matrice di riferimento certificata. Le concentrazioni degli standard di controllo devono essere compresi in un range di $\pm 20\%$ della concentrazione attesa per IPA a 2 o 3 anelli e in un range di $\pm 25\%$ della concentrazione attesa per IPA a 4 o più anelli.

8. Procedura di misura

8.1. Preparazione campione

Il campione deve essere a temperatura ambiente. Prelevare 20 mL di acqua con pipetta di vetro e trasferirli in *vial* in vetro scuro, chiudere la *vial* con tappo a vite munito di setto in silicone/PTFE; aggiungere attraverso il setto 1 μL di soluzione diluita per aggiunte di standard interno (5.5) alla concentrazione di 0,25 $\mu\text{g/mL}$ utilizzando una siringa di vetro.

8.2. Estrazione SPME

L'estrazione SPME dei campioni di acqua viene eseguita con una fibra in silice fusa rivestita di PDMS (spessore del film 7 o 30 μm) installata su un autocampionatore con agitatore termostato. La fibra viene immersa nel campione, sottoposta ad agitazione a 30°C. Gli IPA nativi e deuterati vengono assorbiti sulla fase PDMS alla medesima velocità e con la stessa cinetica. L'utilizzo di standard interno deuterato per la quantificazione degli IPA permette di compensare le variazioni nella distribuzione all'equilibrio. Successivamente alla fase di assorbimento, la fibra SPME viene immediatamente desorbita all'interno della porta di iniezione del gascromatografo, in modalità splitless. Infine, dopo il desorbimento, la fibra viene inserita nella stazione di pulizia; al termine dello stadio di pulizia può avere inizio l'assorbimento di un nuovo campione di acqua.

I principali parametri di controllo dell'autocampionatore per fibra SPME e del GC-MS sono riportati in Tabella 3; i valori sono solo a titolo esemplificativo e vengono scelti da ogni singolo laboratorio in funzione della strumentazione di cui dispone.

8.3. Taratura e determinazione in GC-MS

Analizzare ciascuna *vial* preparata come descritto in 6.6.6 applicando il procedimento di seguito riportato.

Per ciascun livello di taratura si consiglia di eseguire 3 ripetizioni su tre *vial* distinte.

Si consiglia di preparare una nuova retta di taratura almeno una volta al mese e di utilizzare nuovi standard di riferimento diluiti ad ogni sessione analitica.

Dopo aver predisposto la strumentazione secondo le modalità operative prescelte, introdurre i *vial* contenenti le soluzioni di taratura nell'autocampionatore del sistema SPME, seguendo l'ordine di analisi di concentrazioni crescenti, ponendo un bianco di controllo subito dopo la soluzione più concentrata al fine di valutare la possibilità di effetto memoria del sistema. Le condizioni di lavoro per l'analisi mediante spazio di testa possono essere ottimizzate in funzione della strumentazione disponibile e della matrice analizzata intervenendo su alcune variabili strumentali: in Tabella 3 sono indicate, a titolo esemplificativo, le condizioni di lavoro.

Il sistema GC-MS deve essere dotato di software di integrazione dove sono inseriti i parametri di accettabilità dei picchi cromatografici: *width* 1 e *smoothing* 1 secondo, e il valore di accettabilità dell'intensità relativa degli ioni > 30%.

Utilizzando software strumentali in dotazione è possibile effettuare la registrazione, il trattamento dei dati analitici, la costruzione delle rette di taratura, l'elaborazione dei dati dei campioni incogniti e l'emissione dei risultati in modo automatizzato.

Tabella 3. Esempificazione delle condizioni operative per l'analisi mediante SPME e GC-MS. I valori sono solo a titolo esemplificativo e vengono scelti da ogni singolo laboratorio in funzione della strumentazione di cui dispone.

Parametro operativo	Valore/Settaggio
Volume campione nel <i>vial</i>	20 mL in <i>vial</i> da 20 mL
Termostatazione autocampionatore	Velocità di agitazione del campione prima dell'assorbimento = 500 giri/min Tempo di agitazione del campione prima dell'assorbimento = 5 min Temperatura di agitazione = 30°C Tempo di assorbimento = 20 min Temperatura di assorbimento = 30°C
Gas di trasporto	He
Colonna, flusso in colonna	silfenilene polimero, con una polarità equivalente al poli(5% difenil 95% dimetil silossano): 10 m – 0,1 mm – 0,1 µm (o altra colonna); 62 mL/sec
Rampa di temperatura	40°C 1 min – 40°C/min fino a 320°C – 320°C per 1.5 min
T iniettore, transferline, sorgente	280°C, 280°C, 240°C (ionizzazione a impatto elettronico)
Liner	Liner in vetro a tubo dritto, diametro interno 0,75 mm
Split ratio	5
Analizzatore	Singolo quadrupolo, in modalità di acquisizione SIM Energia di ionizzazione= 70 eV Temperatura sorgente = 260°C
Mass Range	Rif. Tabella 4

Date le caratteristiche dinamiche della tecnica strumentale utilizzata è difficile che la risposta si mantenga costante nel tempo, pertanto è necessario verificare la validità della retta di taratura per mezzo di una o più soluzioni di controllo scelte all'interno del campo di misura, preferibilmente una alla concentrazione corrispondente al limite di quantificazione (ICV1, soluzione 6.6.9) e una prossima al valore limite di parametro del Benzo[a]pirene (ICV2, soluzione 6.6.10), inserite all'inizio e/o alla fine di ogni sequenza di campioni in analisi. Si consiglia di preparare le soluzioni per la riqualificazione della retta di taratura da standard appartenenti a un lotto diverso da quello utilizzato per le soluzioni della retta di taratura stessa. Si consiglia come criterio di accettabilità uno scostamento della concentrazione degli analiti non superiore al 25% dal valore nominale. In caso contrario procedere alla costruzione di una nuova curva di taratura e valutare le possibili cause dello scostamento rilevato.

8.4. Controllo del bianco

Ad ogni sessione di analisi è necessario controllare la qualità dell'ambiente di lavoro e dei reagenti.

Per verificare la pulizia dell'ambiente di lavoro e del sistema cromatografico (fibra, colonna, setto, iniettore), all'inizio della sequenza di analisi si consiglia di effettuare l'analisi di 2 bianchi fibra, introducendo la fibra in una *vial* vuota.

Per controllare la purezza dei reagenti, prima dell'analisi degli standard di controllo e dei campioni incogniti, si esegue l'analisi di un bianco acqua, sottoponendo 20 mL di acqua ultrapura (6.1.2) all'intero processo analitico nelle stesse condizioni sperimentali adottate durante l'analisi dei campioni e delle soluzioni di lavoro. Se le concentrazioni degli IPA nel bianco sono superiori ad 1/3 del limite di quantificazione, è necessario individuare ed eliminare la causa di contaminazione prima di riprendere le determinazioni analitiche. In fase di validazione, il laboratorio deve verificare che, dopo l'analisi di soluzioni di standard, la concentrazione degli analiti determinata su un campione di acqua ultrapura sia inferiore al limite di quantificazione, al fine di escludere possibili fenomeni di trascinamento ed effetto memoria.

8.5. Dosaggio del campione

Eseguire l'analisi dei campioni seguendo la procedura (8.1) e applicando le stesse condizioni operative utilizzate per la costruzione delle rette di taratura.

Identificare gli IPA eventualmente presenti nel campione sia tramite confronto dei tempi di ritenzione dei picchi cromatografici del campione con quelli delle soluzioni di taratura (devono rientrare in un range di oscillazione di $\pm 0,2\%$ dei tempi di ritenzione), sia tramite rapporto percentuale degli ioni acquisiti caratteristici (*Target* e *Qualifier*) riportati in Tabella 4 (tolleranza massima del 20%).

Misurare le aree dei picchi degli analiti e dello standard interno in modalità SIM.

Tabella 4. Rapporti m/z utilizzati per la quantificazione degli analiti (ioni Target) e la conferma/identificazione (ioni Qualifier).

Nominativo	lone target m/z	lone qualifier m/z	IS corrispondente	lone target IS m/z
naftalene	128	129	naftalene-d8	138
acenaftilene	152	153	acenaftene-d10	164
acenaftene	154	153	acenaftene-d10	164
fluorene	166	165	fenantrene-d10	188
fenantrene	178	176	fenantrene-d10	188
antracene	178	176	fenantrene-d10	188
fluorantene	202	200	pirene-d10	212
pirene	202	200	pirene-d10	212
benzo(a)antracene	228	226	crisene-d12	240
crisene	228	226	crisene-d12	240
benzo(b)fluorantene	252	253	perilene-d12	264
benzo(k)fluorantene	252	253	perilene-d12	264
benzo(a)pirene	252	253	perilene-d12	264
indeno(1,2,3-c,d)pirene	276	138	perilene-d12	264
dibenzo(ah)antracene	278	279	perilene-d12	264
benzo(g,h,i)perilene	276	138	perilene-d12	264

9. Calcolo ed espressione dei risultati

9.1. Calcolo della concentrazione

Dai valori delle aree dei picchi cromatografici è possibile calcolare la concentrazione dei composti identificati utilizzando la retta di taratura del corrispondente analita.

Si raccomanda inoltre di verificare che la concentrazione del campione cada all'interno dell'intervallo di taratura. Qualora le concentrazioni degli analiti risultino superiori a tale intervallo, si procede all'analisi del campione diluito.

9.2. Espressione dei risultati

La concentrazione degli IPA nel campione va espressa in accordo con la normativa vigente.

10. Prestazioni del metodo

Il limite di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono stati valutati da un singolo laboratorio mediante il calcolo dallo scarto tipo dei residui ricavato dall'elaborazione statistica della retta di taratura; a questo scopo è stata studiata una retta su 8 punti, in un intervallo di concentrazione compreso tra 0,0005-0,1 µg/L. Tutti i parametri sono riportati nella sinossi specifica all'interno della sezione "Caratteristiche di prestazione dei metodi".

Bibliografia

- APAT/IRSA-CNR 5080:2003 *Metodi Analitici per le Acque. 29/2003, 5140: Solventi organici aromatici (spazio di testa statico +GC-FID; spazio di testa dinamico+GC-FID)*. Roma: APAT/IRSA-CNR; 2003.
- International Agency for Research on Cancer. *Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs*. Lyon: IARC; 1987.
- Italia. Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della Direttiva 98/83/Ce relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 52, 3 marzo 2001.
- Italia. Decreto Ministeriale 14 giugno 2017. Recepimento della direttiva (UE) 2015/1787 che modifica gli allegati II e III della direttiva 98/83/CE sulla qualità delle acque destinate al consumo umano. Modifica degli allegati II e III del decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 192, 18 agosto 2017.
- U.S. Environmental Protection Agency. *Method 610 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*. Environmental Protection Agency. Washington DC: February 1984.
- U.S. Environmental Protection Agency. *Method 8272 Parent and Alkyl Polycyclic Aromatics in sediment pore water by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry in selected ion monitoring guide*. Environmental Protection Agency. Washington DC: February 2007.

ISS.PGA.901.REV01

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

0. Introduzione

Il campionamento è la procedura mediante la quale una frazione di una determinata sostanza, materiale o prodotto è prelevata per fornire un campione rappresentativo dell'oggetto del controllo nella sua totalità per l'esecuzione di prove o tarature. In circostanze specifiche, ad esempio in seguito ad indagini per l'individuazione di agenti eziologici presunti responsabili di malattie idrodiffuse, il campione può non essere rappresentativo ma determinato dalla sua disponibilità.

La corrente normativa in materia di controlli sulle acque destinate al consumo umano stabilisce i criteri per individuare, nell'ambito dei controlli interni ed esterni relativi ad una determinata zona di approvvigionamento, un piano di campionamento adeguato alle finalità dei controlli, presieduto da un'analisi di rischio (piano di sicurezza dell'acqua); sono indicate, tra l'altro, le frequenze minime di campionamento, le strategie da seguire per l'individuazione dei punti di controllo, le caratteristiche dei punti di prelievo, la definizione dei parametri oggetto di controllo e dei siti di campionamento sulla base dell'analisi di rischio. Rimandando pertanto alle disposizioni della normativa vigente per gli aspetti inerenti la pianificazione dei campionamenti, è da rilevare che, nell'ambito delle operazioni a monte della procedura analitica, le procedure di prelievo e conservazione dei campioni possono condizionare significativamente la qualità del dato e compromettere, in taluni casi, il giudizio di idoneità sulle acque oggetto dei controlli.

Obiettivo della presente procedura è definire i requisiti generali in merito al prelievo, al trasporto e alla conservazione dei campioni da analizzare al fine di evitarne il deterioramento, l'alterazione e la contaminazione.

In particolare, in funzione delle finalità del controllo, della natura del campione prelevato, degli analiti oggetto di indagine, delle circostanze ambientali e delle risorse disponibili, deve essere assicurato che il campione:

- il campione sia prelevato e trasportato in maniera tale che mantenga inalterate le proprie caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche fino al raggiungimento del laboratorio di analisi;
- sia conservato in modo tale da evitare modificazioni dei suoi componenti e delle caratteristiche da valutare dal prelievo fino al momento delle analisi.

1. Requisiti generali

La presente procedura ha per oggetto le disposizioni generali sul prelievo e la conservazione dei campioni di acque da destinare e destinate al consumo umano, incluse le acque destinate alla produzione alimentare, le acque minerali naturali e le acque di sorgente, acque di piscina e acque utilizzate in ambito medico per produzione di acque di dialisi.

Ad integrazione delle indicazioni contenute nella procedura, devono essere considerate eventuali informazioni di specifico dettaglio contenute all'interno dei singoli metodi analitici.

2. Dispositivi e materiali

2.1. Rubinetti di prelievo sulla rete

Il prelievo di campioni a livello di rete di distribuzione dovrebbe essere realizzato attraverso una linea e rubinetto dedicato. La linea di campionamento dovrebbe avere i seguenti requisiti:

- lunghezza ridotta;
- connessione diretta al flusso principale senza giunzioni che potrebbero causare volumi morti e stagnazioni;
- materiali adeguati al contatto con acque destinate al consumo umano;
- diametro adeguato alle dimensioni dei contenitori utilizzati per il campionamento;
- facilità di accesso e spazi adeguati per consentire le operazioni di prelievo;
- resistenza alle operazioni di pulizia e disinfezione e protezione da atti di vandalismo e contaminazione.

2.2. Contenitori

I contenitori utilizzati per il prelievo e la conservazione dei campioni devono rispondere a requisiti generali di robustezza e idoneità alle condizioni di conservazione e a requisiti specifici che riguardano l'inerzia dei materiali costituenti il contenitore al fine di:

- non cedere o adsorbire sostanze, che alterino la composizione del campione o le proprietà degli analiti;
- essere resistenti ai vari costituenti presenti nel campione;
- garantire la perfetta tenuta dei gas disciolti e dei composti volatili se oggetto di determinazioni.

In funzione della natura dell'analita, della tipologia di analisi e della tecnica analitica adottata si dovrà eseguire il prelievo utilizzando i contenitori di materiale adeguato, che saranno stati precedentemente sottoposti a pulizia ordinaria e/o seguendo, ove indicato, procedure specifiche richieste dal metodo analitico.

In Tabella 1 sono riportati alcuni materiali idonei per la raccolta e conservazione dei campioni in funzione dei parametri oggetto di valutazione. I materiali più usati per la costruzione dei contenitori utilizzabili per i prelievi di cui alla presente procedura sono il vetro e la plastica.

2.2.1. Contenitori in vetro

Possono essere usati nella maggior parte dei casi, salvo espresso divieto riportato dal metodo analitico allo scopo di evitare falsi positivi. Rappresentano i contenitori di elezione per i campioni da sottoporre ad analisi di parametri organici, ad esclusione delle classi di composti che si possono adsorbire sul vetro per le quali sono riportate specifiche raccomandazioni nella procedura del metodo analitico. Si differenziano per la composizione e per la resistenza agli agenti fisici e chimici e tra questi i più indicati sono quelli in vetro Pyrex (borosilicato) o equivalente e quelli in Vycor (ad alto contenuto di silicio) di qualità superiore. Sono di vetro chiaro o di vetro scuro, con tappo di plastica a vite, munito di guarnizione in materiale non interferente nella successiva analisi, o in vetro smerigliato.

Per l'analisi delle sostanze volatili sono indicate le *vial* EPA da 40 mL, diffusamente utilizzate per il prelievo di piccole aliquote da inserire direttamente sugli autocampionatori.

Tabella 1. Parametri di conservazione consigliati¹

Determinazione	Contenitore ²	Conservazione	Tempo max di conservazione ³	Tempo consigliato per l'analisi
Acrilammide	PE;V	refrigerare ⁴ al buio	15 giorni	-
Antimonio	PE;V	acidificare con HNO ₃ a pH ≤ 2	- ⁵	30 giorni
Arsenico	PE ^a ;V ^a	acidificare con HNO ₃ a pH ≤ 2	-	7
Arsenico	V	refrigerare	3 giorni	-
Benzo(a)pirene	V scuro	refrigerare al buio	7 giorni	-
Boro	PE	acidificare con HNO ₃ a pH ≤ 2	-	-
Bromato	PE; V	refrigerare al buio	30 giorni	-
Cadmio	PE ^a ;V ^{ab}	acidificare con HNO ₃ a pH ≤ 2	-	30 giorni
Cromo totale	PE ^a ;V ^a	acidificare con HNO ₃ a pH ≤ 2	-	30 giorni
Rame	PE ^a ;V ^a	acidificare con HNO ₃ a pH ≤ 2	-	30 giorni
1,2 dicloroetano	V	refrigerare chiusura a tenuta di gas, buio	7 giorni	2 giorni ⁷
Epicloridina	V	refrigerare al buio	-	-
Fluoruro	PE	-	2 giorni	24 ore
Piombo	PE ^a ;V ^{ab}	acidificare con HNO ₃ a pH ≤ 2	-	30 giorni
Mercurio	V ^{ab}	acidificare con HCl al 7% v/v	-	7 giorni
Nichel	PE ^a ;V ^{ab}	acidificare con HNO ₃ a pH ≤ 2	-	30 giorni
Nitrato (come NO ₃)	PE;V	refrigerare	2 giorni	24 ore
Nitrito (come NO ₂)	PE;V	refrigerare	2 giorni	24 ore
Antiparassitari	V scuro	refrigerare	15 giorni	-
IPA	V scuro	refrigerare al buio	7 giorni	-
Selenio	PE ^a ;V ^a	acidificare a pH ≤ 2 con HNO ₃	-	30 giorni
Tetracloroetilene	V	chiusura a tenuta di gas, buio	7 giorni	2 giorni ⁷
Tricloroetilene	V	chiusura a tenuta di gas, buio	7 giorni	2 giorni ⁷
Triometani-totale	V	chiusura a tenuta di gas, buio	7 giorni	2 giorni ⁷
Cloruro di vinile	V	refrigerare, chiusura a tenuta di gas, buio	7 giorni	2 giorni ⁷
Clorito	PE;V	refrigerare	2 giorni	24 ore
Vanadio	PE ^a ;V ^{ab}	acidificare con HNO ₃ a pH=2	-	30 giorni
Alluminio	PE ^a ;V ^a	acidificare con HNO ₃ a pH ≤ 2	-	30 giorni
Ammonio	PE;V	refrigerare congelare o acidificare a pH ≤ 2 e refrigerare	2 giorni	24 ore
Cloruro	PE;V	-	7 giorni	-
Colore	PE;V	refrigerare	-	24 ore ⁶
Conduttività elettrica	PE;V	refrigerare	24 ore	24 ore ⁶
Conc. ioni idrogeno	PE;V	refrigerare	3 giorni	24 ore ⁶
Ferro	PE ^a ;V ^a	acidificare con HNO ₃ a pH ≤ 2	7 giorni ⁶	30 giorni ⁶
Manganese	PE ^a ;V ^{ab}	acidificare con HNO ₃ a pH ≤ 2	-	30 giorni
Odore	V	refrigerare	-	-
Ossidabilità	V	acidificare con H ₂ SO ₄ a pH ≤ 2 e refrigerare	6 ore	-
Solfato	PE;V	refrigerare	24 ore	-
Sodio	PE;V	-	7 giorni	30 giorni
Sapore	V	refrigerare	-	-
Carbonio organico totale (TOC)	PE;V	refrigerare	6 ore	24 ore
Torbidità	PE;V	refrigerare	7 giorni	24 ore
Durezza	PE;V	refrigerare	24 ore	24 ore
Solidi indisciolti	PE;V	refrigerare	7 giorni	-
Disinfettante residuo	V	-	1 mese	24 ore ⁶

¹ Modalità di conservazione specifiche per i diversi parametri possono essere riportate nei singoli metodi.

² PE = polietilene; V = vetro; PE^a e V^a = polietilene o vetro sciacquato con HNO₃ (1:1); V^b = vetro borosilicato.

³ I valori si riferiscono a periodi di conservazione per i quali è stato verificato che l'analita, nelle modalità di conservazione adottate, si è rilevato sostanzialmente stabile; estensioni dei periodi indicati così come differenti modalità di conservazione possono essere adottate previa adeguata verifica della stabilità del campione e dell'analita.

⁴ refrigerare = conservare a temperatura di 1-10°C al buio.

⁵ non rilevante/non applicabile; nel caso del periodo di conservazione può assumersi 6 mesi sebbene sia preferibile eseguire le analisi entro un mese dalla ricezione del campione.

⁶ Talvolta può essere necessaria la determinazione in fase di prelievo

⁷ Solo per campioni non addizionati con ipoclorito di sodio, in base a quanto descritto dal "Chapter Four" dei metodi EPA

2.2.2. Contenitori in plastica

Si possono impiegare quando non sia richiesta una particolare impermeabilità ai gas o nel caso in cui non vi siano interferenze dovute agli additivi impiegati nella produzione.

Presentano il vantaggio di essere leggeri e resistenti all'urto, agli agenti chimici e alle escursioni termiche e, nella maggior parte dei casi, hanno costi competitivi rispetto ai recipienti in vetro.

Si differenziano per i diversi formulati del monomero di partenza e, nell'ordine di maggior utilizzo, comprendono:

- contenitori in polietilene o polipropilene;
- contenitori in policarbonato, particolarmente utilizzati per l'analisi dei metalli pesanti;
- contenitori in polimetilpentene (TPX™);
- contenitori in politetrafluoroetilene (PTFE) o Teflon.

I contenitori in polietilene e il TPX™ vanno impiegati quando è necessario determinare concentrazioni dell'ordine di 10⁻⁹ parti (m/m o m/v). È consigliato l'utilizzo di polietilene opaco per l'analisi dei parametri chimico-fisici. I contenitori in PTFE sono, tra i contenitori in plastica, i migliori per l'analisi di composti organici, ad esclusione dei composti perfluorurati.

3. Prelievo

3.1. Acque destinate al consumo umano, acque di sorgente e acque utilizzate per la produzione di acque per dialisi

3.1.1. Punti di prelievo

In base al DM 14 giugno 2017, i punti di prelievo dei campioni sono individuati in modo da garantire l'osservanza dei punti in cui i valori devono essere rispettati, di cui all'art. 5, comma 1 del DL.vo 31/2001. Nel caso di una rete di distribuzione, i campioni possono essere prelevati nella zona di approvvigionamento o presso gli impianti di trattamento per particolari parametri se si può dimostrare che il valore ottenuto per i parametri in questione non può essere modificato negativamente fino al punto di conformità. Nella misura del possibile, il numero di campioni deve essere equamente distribuito in termini di tempo e luogo.

La selezione tra prelievi al punto di captazione, in uscita agli impianti di trattamento, in fase di distribuzione (inclusi punti di disinfezione secondaria), al punto di consegna, o all'utenza dipende dall'articolazione e complessità dei sistemi idrici e dalla natura dei parametri oggetto di valutazione e, più in generale, da una valutazione del rischio sul modello di Water Safety Plan. Il livello di alcuni parametri, tra i quali, ad esempio, arsenico, boro, fluoro, selenio può infatti essere considerato indipendente dalle fasi a valle della captazione mentre altri parametri, tra i quali zinco, piombo, rame, nichel, cromo, ferro, possono essere influenzati più o meno significativamente dai materiali costituenti le reti.

Nelle Tabelle 2 e 3 sono riportate, a titolo orientativo, indicazioni per la selezione dei punti di prelievo in considerazione della suscettibilità dei diversi parametri a subire cambiamenti nella rete di adduzione principale (dall'uscita dell'impianto di trattamento fino al punto di consegna) o nella rete di distribuzione interna (dal punto di consegna all'utenza).

Tabella 2. Possibili punti di prelievo per la determinazione di parametri chimici (DL.vo 31/2001 allegato I parte B)

Parametro	Immissione in rete ¹	Punto di consegna ²	Utenza ³	Note
Acrilammide			✓	
Antimonio			✓	A
Arsenico	✓	✓	✓	
Benzene	✓	✓	✓	
Benzo(a)pirene		✓	✓	B
Boro	✓	✓	✓	
Bromato	✓	✓	✓	
Cadmio			✓	C
Cromo			✓	
Rame			✓	
Cianuri	✓	✓	✓	
1,2-dicloroetano	✓	✓	✓	
Epicloridrina			✓	B
Fluoruro	✓	✓	✓	A
Piombo			✓	
Mercurio	✓	✓	✓	
Nichel			✓	
Nitrato	✓		✓	
Nitrito	✓		✓	C,D
Antiparassitari	✓	✓	✓	C,D
Antiparassitari-Totale	✓	✓	✓	
IPA		✓	✓	
Selenio	✓	✓	✓	
Tetracloroetilene e Tricloroetilene	✓	✓	✓	
Triometani,totale		✓	✓	B
Cloruro di vinile	✓		✓	B,C,E
Clorito			✓	A,B,F
Vanadio	✓	✓	✓	

¹ cfr. 3.1.1.1 a); ² cfr. 3.1.1.1 b); ³ cfr. 3.1.1.1 c).

- A** Conformità dimostrabile di norma attraverso le specifiche di prodotto; determinazione analitica necessaria sulla base di valutazione del rischio.
- B** Campionare al punto di utenza nel caso la valutazione del rischio evidenzi possibilità che la rete di distribuzione sia contaminata da benzene, 1,2-dicloroetilene, tetracloroetilene, tricloroetilene, cloroformio e cloruro di vinile.
- C** Campionare al punto di utenza nel caso in cui è adottata disinfezione secondaria (rilancio) all'interno della rete di distribuzione.
- D** Campionamenti da prevedere all'immissione in rete e al punto di utenza.
- E** Può essere selezionato il campionamento all'immissione in rete sulla base della valutazione del rischio e qualora vengano adottati adeguati fattori di sicurezza.
- F** Campionare all'immissione in rete se è stato evidenziato un rischio dovuto alla presenza di precursori della sostanza.
- G** Campionare al punto di utenza qualora sostanze a base di alluminio siano impiegate per trattamenti o impianti di distribuzione.
- H** Campionare al punto di utenza qualora vengano adottati trattamenti come la disinfezione con cloroammine a valle dell'impianto di potabilizzazione.
- I** Campionare al punto di utenza qualora vengano adottati trattamenti come l'addolcimento a valle dell'impianto di potabilizzazione.
- L** Campionare all'immissione in rete se è impiegata acqua superficiale da destinare al consumo umano.

Tabella 3. Possibili punti di prelievo per la determinazione di parametri chimici (DL.vo 31/2001 allegato I parte C)

Parametro	Immissione in rete ¹	Punto di consegna ²	Utenza ³	Note
Alluminio	✓	✓	✓	G
Ammonio	✓	✓	✓	H
Cloruro	✓	✓	✓	
Colore			✓	
Conducibilità			✓	
Concentrazione ioni idrogeno			✓	
Ferro			✓	
Manganese			✓	
Odore			✓	
Ossidabilità			✓	
Solfato	✓	✓	✓	I
Sodio	✓	✓	✓	
Sapore			✓	
Carbonio organico totale			✓	
Torbidità	✓		✓	L
Durezza			✓	
Residuo secco a 180°C			✓	
Disinfettante residuo			✓	

¹ cfr. 3.1.1.1 a); ² cfr. 3.1.1.1 b); ³ cfr. 3.1.1.1 c).

G Campionare al punto di utenza qualora sostanze a base di alluminio siano impiegate per trattamenti o impianti di distribuzione.

H Campionare al punto di utenza qualora vengano adottati trattamenti come la disinfezione con cloroammine a valle dell'impianto di potabilizzazione.

I Campionare al punto di utenza qualora vengano adottati trattamenti come l'addolcimento a valle dell'impianto di potabilizzazione.

L Campionare all'immissione in rete se è impiegata acqua superficiale da destinare al consumo umano.

3.1.1.1. Acque di rete: immissione in rete, punto di consegna e utenza

Nel caso in cui le acque siano fornite mediante una rete di distribuzione, sulla base della struttura del sistema idrico e della valutazione del rischio (3.1.1) i campioni andranno prelevati:

a) *nel punto di immissione in rete*

tenendo conto dell'esistenza di impianti di trattamento e della struttura della rete i punti di prelievo possono essere individuati come segue:

- per acque immesse direttamente in rete senza trattamenti il punto di prelievo va individuato immediatamente dopo l'opera di presa;
- per acque trattate il punto di prelievo va individuato all'uscita del potabilizzatore;
- per acque miscelate può essere previsto il prelievo delle acque prima della miscelazione e deve essere individuato un punto di prelievo in rete a valle della miscelazione;
- per acque provenienti da serbatoi, invasi o pozzi piezometrici un punto di prelievo deve essere previsto a valle dell'impianto di accumulo (immissione in rete);

b) *al punto di consegna*

generalmente il contatore, in cui termina la responsabilità del gestore del servizio idrico e subentra la responsabilità del gestore della rete di distribuzione interna in generale, va

previsto un prelievo al contatore (ove possibile mediante rubinetto dedicato) o, quando questo non sia praticabile o possa essere causa di contaminazione, nel punto della rete più prossimo e che sia comunque rappresentativo (es. una fontanella pubblica);

c) *direttamente presso l'utenza*

rubinetto usato con maggior frequenza per impieghi potabili e domestici (preferibilmente della cucina).

3.1.1.2. Acque minerali naturali e acque di sorgente, alla captazione

Il prelievo di campioni di acque minerali naturali e acque di sorgente avviene direttamente nel punto di emergenza naturale o da perforazione. In ogni caso il punto di prelievo deve essere tale da garantire la sicurezza degli operatori.

Dove vi sia miscelazione, occorre prevedere punti di campionamento separati per ognuna delle fonti di approvvigionamento e un punto di prelievo immediatamente dopo la miscelazione.

Per i controlli di tipo chimico delle acque minerali naturali e di sorgente il campione andrà prelevato alla captazione (sorgente, pozzo, ecc.) e ai depositi di accumulo delle acque: un controllo all'anno.

Il punto di prelievo deve essere tale da garantire in ogni caso la sicurezza degli operatori.

3.1.1.3. Acque utilizzate per la produzione di acque per dialisi

Ai fini del presente documento sono considerate acque utilizzate per la produzione di acque per dialisi le acque di rete all'ingresso al sistema di trattamento. Il prelievo di campioni di acque utilizzate per la produzione di acque per dialisi deve essere effettuato al punto di ingresso al sistema di trattamento.

3.1.1.4. Acque fornite da cisterne e contenitori

Nel caso di acque fornite da una cisterna fissa o mobile il campione andrà prelevato direttamente nel punto in cui l'acqua fuoriesce dalla cisterna o contenitore.

3.1.1.5. Acque confezionate

Nel caso di acque confezionate, in bottiglie o contenitori e rese disponibili per il consumo umano, i campioni andranno prelevati preferibilmente nel punto in cui sono imbottigliate o introdotte nei contenitori.

3.1.1.6. Acque utilizzate da imprese alimentari

Nel caso di utilizzo nelle produzioni alimentari il campione andrà prelevato nel punto in cui l'acqua è utilizzata dall'impresa, in entrata nel ciclo produttivo e/o nelle fasi di lavorazione.

3.1.2. Procedura di prelievo

In ottemperanza al DM 14 giugno 2017 il campionamento al punto in cui i valori devono essere rispettati soddisfa i seguenti obblighi:

- I campioni per verificare l'osservanza di obblighi relativi ad alcuni parametri chimici (in particolare rame, piombo e nichel) sono prelevati dal rubinetto del consumatore senza prima far scorrere l'acqua. Occorre prelevare un campione casuale diurno pari a un litro. In alternativa, si possono utilizzare metodi che ricorrono al tempo fisso di ristagno e riflettono più precisamente le situazioni locali, a condizione che, a livello di zona di approvvigionamento, ciò non rilevi un minor numero di casi di non conformità rispetto all'utilizzo del metodo casuale diurno;

- Il campionamento presso la rete di distribuzione, ad eccezione che presso i rubinetti dei consumatori, deve essere conforme alla norma ISO 5667-5.

L'operazione di prelievo è accompagnata dalla redazione del verbale di prelievo.

Appena ultimate le operazioni di prelievo:

- tappare/sigillare il/i contenitore/i e provvedere alla sua identificazione (cfr. par. 5);
- riporre il campione secondo le idonee modalità di conservazione (cfr. 6).

3.1.2.1. Altri prelievi

Operazioni di prelievo multiple per parametri chimici presso lo stesso sito vanno condotte adottando le stesse modalità descritte in precedenza (3.1.2).

L'eventuale prelievo per l'analisi microbiologica può essere condotto, salvo diverse indicazioni, presso un altro sito di prelievo (es. diverso rubinetto della stessa struttura) o, se nello stesso punto di prelievo di quello per l'analisi chimica, successivamente al prelievo dei campioni per l'analisi chimica.

3.2. Acque da destinare al consumo umano

3.2.1. Acqua di pozzo

Prelevare i campioni di acqua solo dopo aver spurgato abbondantemente il pozzo (da 3 fino a 10 volte il volume dello stesso), registrando indicativamente il volume e il flusso dello spurgo, in quanto questi parametri possono influire nel drenaggio di sostanze presenti nel terreno.

3.2.2. Acque superficiali

Molte sono le variabili che influenzano la qualità del prelievo eseguito su corsi d'acqua, laghi o bacini idrici da destinare al consumo umano. L'idrografia (volumi, portate, profondità, velocità di scorrimento) e l'orografia del sistema e, più in generale la conformazione e il contesto territoriale in cui si colloca il sistema idrologico in combinazione con condizioni meteorologiche, di stagionalità, luminosità, temperatura, ora del giorno/notte, determinano una notevole variabilità nelle caratteristiche del corpo idrico e di conseguenza, rendono difficoltosa la definizione puntuale per quanto concerne le modalità di prelievo da adottare. Ad esempio, fiumi o laghi caratterizzati da due fasce distinte di temperatura (epilimnio e ipolimnio) obbligano a scegliere la profondità di prelievo che sia maggiormente rappresentativa del reale flusso di alimentazione di un impianto di trattamento per scopo idropotabile. Nella scelta della profondità cui eseguire il prelievo si dovrà tenere conto anche della caratteristica del fondale in modo da evitare la raccolta di sedimenti ricchi ad esempio di metalli pesanti o di agglomerati biologici. Poiché l'obiettivo non è il controllo della qualità ambientale del corpo idrico, il campionamento deve essere pianificato in modo da essere rappresentativo della qualità delle acque prelevate per il consumo umano.

Come indicazioni generali per il prelievo si raccomanda di:

- individuare la profondità di prelievo più corretta anche in funzione delle modalità di captazione;
- eseguire un prelievo anche in superficie avendo l'avvertenza di tenere il contenitore con il collo in controcorrente ed evitando gorgogliamento;
- evitare di prelevare in porzioni di sistema caratterizzate da eccessivo rimescolamento (turbolenza) al fine di evitare la perdita di sostanze volatili disciolte o la possibilità di trovare disciolti vapori stratificati all'interfaccia aria/acqua;

- evitare di prelevare campioni in prossimità di sbarramenti, perché vi si possono riscontrare concentrazioni superiori alla norma di sostanze poco miscibili con densità minore dell'acqua;
- evitare di prelevare campioni in prossimità del fondo;
- utilizzare apposite attrezzature per i prelievi di profondità con apertura del contenitore comandata a distanza manualmente o automaticamente;
- annotare nel verbale di prelievo (5) ogni informazione utile quale condizioni meteorologiche, profondità del prelievo e stato del sistema (es. condizioni di piena).

3.3. Acque di piscina

La regolamentazione specifica per le piscine prevede per l'acqua di approvvigionamento tutti i requisiti di potabilità previsti dalle vigenti normative (fatta eccezione per la temperatura) e stabilisce, inoltre, che i requisiti di qualità dell'acqua in vasca siano raggiunti in qualsiasi punto; i prelievi da effettuare sono i seguenti:

- *acqua di approvvigionamento*: prelevare un campione da apposito rubinetto posto su tubo di adduzione;
- *acqua di immissione in vasca*: prelevare un campione da rubinetto posto sulle tubazioni di mandata alle singole vasche a valle degli impianti di trattamento;
- *acqua in vasca*: un campione prelevato in un qualsiasi punto in vasca assume pieno valore ai fini dei controlli previsti dalla regolamentazione vigente.

Al fine di garantire l'armonizzazione delle procedure, va effettuato il prelievo di quattro aliquote, ad una profondità di circa 10 cm, in altrettanti punti rappresentativi di una situazione media (equidistanti dai punti di immissione e di uscita) ovvero, laddove impraticabile, la situazione peggiore (in prossimità dell'uscita); attraverso la miscelazione di un uguale volume di ciascuna diversa aliquota può essere ricavato un campione composito. Le procedure di prelievo eseguite devono essere annotate in dettaglio (eventualmente rimandando ad apposita procedura) nel verbale di prelievo o a documentazione ad esso annessa.

4. Volume del campione

4.1. Volume di prelievo

Prelevare volumi di campione adeguati alla tipologia dei parametri da determinare, alle tecniche e alle strumentazioni analitiche utilizzate.

Come indicazioni generali non vincolanti:

- un volume di campione pari a 1,0 L è di norma sufficiente per tutte quelle determinazioni che ricadono nell'ambito delle analisi inorganiche;
- per quanto attiene le analisi organiche e radiologiche si rimanda a quanto previsto dagli specifici metodi analitici di riferimento;
- per le analisi degli elementi da eseguirsi in AA, ICP-OES e MS può essere sufficiente prelevare un volume di campione pari a 250 mL.

Valutare l'opportunità di prelevare eventuali campioni per la replica delle determinazioni e/o eventuali indagini aggiuntive.

4.2. Ripartizione in aliquote

Nel caso in cui un campione originariamente prelevato (3) sia da suddividere in aliquote per eseguire differenti determinazioni analitiche, effettuare le operazioni di ripartizione prima di qualsiasi trattamento del campione e adottare tutte le misure adeguate a garantire che:

- il volume di ciascuna aliquota sia adeguato all'esecuzione della/e prova/e cui è destinato;
- sia evitata qualsiasi contaminazione del materiale di prova nella fase di ripartizione;
- sia garantita la rintracciabilità di ogni singola aliquota e sia documentata l'operazione di suddivisione in aliquote.

5. Identificazione dei campioni e verbale di prelievo

Ogni campione deve riportare un'etichetta identificativa indelebile che lo renda univocamente identificabile, solidamente fissata al contenitore. La codifica per ogni campione deve garantire una piena rintracciabilità e consentire agevolmente di risalire al verbale di prelievo associato. Nel verbale di prelievo devono essere riportate almeno le seguenti informazioni: numero di identificazione, nome dell'esecutore del prelievo, data e ora del prelievo, ubicazione (nome) e codifica (es. Codice identificativo definito con gli organi di controllo) del luogo del prelievo, tipologia del prelievo e metodo di prelievo, ove disponibile, tipologia del punto di prelievo (es. rete, pozzo, ecc.), natura e costituzione del campione, nominativi di eventuali altre parti interessate. Nel verbale deve essere anche riportata ogni indicazione relativa a campioni contenenti materiali anomali con descrizione dell'anomalia osservata; i campioni anomali devono essere chiaramente contrassegnati. Alcune indicazioni utili che possono essere riportate in aggiunta nel verbale riguardano le coordinate GPS (*Global Position System*) del punto di prelievo, eventuali dettagli sul punto del prelievo – compresa un'eventuale fotografia digitale – e sulle operazioni effettuate, in particolare se in deviazione dalle procedure, eventuale conservante o stabilizzante aggiunto. Devono infine essere registrati sul verbale o su documenti ad esso annessi, o comunque facilmente rintracciabili, i risultati delle determinazioni in situ effettuate contestualmente al prelievo. Il verbale deve essere firmato dal responsabile delle operazioni di prelievo ed eventualmente da altre parti interessate presenti al prelievo. Alla consegna in laboratorio deve essere firmato un atto di accettazione del campione.

6. Conservazione dei campioni

L'adozione di adeguate tecniche di conservazione consente di ritardare o attenuare significativamente i processi chimici e biologici che inevitabilmente continuano sul campione dopo il prelievo e potrebbero modificare la natura del campione stesso e/o le risultanze analitiche sul parametro oggetto di indagine. I metodi di conservazione sono infatti generalmente rivolti a:

- evitare contaminazioni del campione;
- rallentare l'azione di agenti biologici;
- rallentare l'idrolisi di composti liberi e complessi;
- ridurre la volatilità di sostanze disciolte;
- ridurre gli effetti di adsorbimento.

Modalità di conservazione specifiche per i diversi parametri possono essere riportate nei singoli metodi.

6.1. Periodo di conservazione e tempi di analisi

Tra il prelievo e l'analisi del campione deve intercorrere il minor tempo possibile.

La Tabella 1 riporta, a titolo indicativo, il periodo di conservazione per il quale è stata verificata una sostanziale stabilità dell'analita, nelle modalità di conservazione adottate; estensioni dei periodi indicati così come differenti modalità di conservazione possono essere adottate previa adeguata verifica della stabilità del campione e dell'analita. Le analisi di alcuni costituenti e dei parametri fisici vanno condotte rapidamente, direttamente in campo.

6.2. Trasporto e conservazione

Il trasporto dei campioni deve avvenire in ambiente buio e refrigerato, generalmente mediante utilizzo di borse termiche o altri contenitori termoisolanti equipaggiati con piastre eutettiche. Deve essere evitato il congelamento del campione. In laboratorio i campioni vanno conservati ad una temperatura di refrigerazione compresa nell'intervallo tra 1°C e 10°C, salvo specifiche indicazioni.

La Tabella 1 riporta, a titolo indicativo, le modalità di conservazione nelle quali è stata verificata una sostanziale stabilità dell'analita nel periodo di conservazione indicato.

Tutti i campioni, indipendentemente dalla loro natura, devono pervenire in Laboratorio nel minor tempo possibile. Tra il momento del prelievo e la consegna in Laboratorio, i tempi massimi vanno da un minimo di 6-8 ore (parametri sensibili e/o volatili) ad un massimo di 24 ore. Si consiglia la tracciabilità delle temperature: dal campionamento, durante il trasporto, sino alla consegna in laboratorio, mediante dispositivi quali data logger e/o campione "civetta".

Bibliografia

- APAT/IRSA-CNR. *Metodi Analitici per le Acque. 29/2003, 1030: Metodi di campionamento*. Roma: APAT/IRSA-CNR; 2003.
- Fuiano G, Alloatti S, Bolasco P, Canavese C, Cappelli G, Pedrini L, Pizzarelli F, Pontoriero G, Santoro A, Anastasio P, Teatini U. Linee guida su acque e soluzioni per dialisi. *Giornale Italiano di Nefrologia* 2005;22(3):246-73.
- Hoekstra EJ, Aertgeerts R, Bonadonna L, Cortvriend J, Drury D, Goossens R, Jiggins P, Lucentini L, Mendel B, Rasmussen S, Tsvetanova Z, Versteegh A, Weil M, *The advice of the Ad-Hoc Working Group on Sampling and Monitoring to the Standing Committee on Drinking Water concerning sampling and monitoring for the revision of the Council Directive 98/83/EC*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities 2008. (JRC Scientific and Technical Reports EUR 23374 EN-2008).
- Italia. Ministero della Salute. Decreto 14 giugno 2017. Recepimento della direttiva (UE) 2015/1787 che modifica gli allegati II e III della direttiva 98/83/CE sulla qualità delle acque destinate al consumo umano. Modifica degli allegati II e III del decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 192 del 18.8.2017.

ISS.CAA.037.REV00

PCB: METODO AUTO-SPME-HS-GC-MSMS

0. Generalità e definizioni

I PCB sono classe di composti aromatici biciclici costituiti da molecole di bifenile variamente clorate. Sono composti stabili, parzialmente solubili in acqua, presentano bassa tensione di vapore che decresce all'aumentare del numero di atomi di cloro.

I fattori che possono influenzare la loro vaporizzazione sono: il contenuto di sostanza organica e il pH.

1. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione dei PCB aventi i seguenti numeri di Ballschmider: 18, 28, 31, 44, 52, 77, 81, 95, 99, 101, 105, 110, 114, 118, 123, 126, 128, 138, 146, 149, 153, 156, 157, 167, 169, 170, 177, 180, 183, 187, 189.

Alle condizioni riportate in questo metodo (utilizzo colonna GC) i congeneri #28 e #31 coeluiscono pertanto vengono quantificati come somma.

Il metodo si applica alle acque destinate e da destinare al consumo umano, in particolare alle acque minerali naturali e alle acque sotterranee, secondo le definizioni riportate nelle normative vigenti.

Il campo di applicazione del metodo consente di rivelare concentrazioni 0,1 ng/L a 50,0 ng/L.

2. Principio del metodo

Il metodo permette la determinazione dei policlorobifenili (PCB) mediante estrazione con auto-SPME con tecnica dello spazio di testa, separazione gas-cromatografica e rivelazione tramite spettrometria di massa con triplo quadrupolo (auto SPME-HS-GC-MSMS). Un volume noto del liquido in esame è introdotto in una fiala di vetro (*vial*) con chiusura ermetica e posto in riscaldamento sotto agitazione mediante un sistema automatico di campionamento. La fibra SPME viene esposta per il campionamento dei PCB nello spazio di testa, successivamente viene desorbita nell'iniettore del GC e analizzata con tecnica MSMS.

L'identificazione avviene per confronto, con soluzioni di taratura, dei tempi di ritenzione e degli ioni caratteristici dei PCB in esame, mentre la quantificazione si esegue per confronto tra le aree dei picchi ottenuti iniettando il campione e le aree dei picchi ottenuti dalle soluzioni di taratura, con il metodo della diluizione isotopica.

3. Interferenze e cause di errore

La determinazione dei PCB può essere affetta da errori in eccesso a seguito di contaminazione della fibra tra un campione e il successivo. Per evitare il fenomeno della cross-contaminazione è

possibile fare una pulizia mediante introduzione della fibra nella stazione di pulizia posta sull'autocampionatore. Analizzare successivamente un bianco fibra per confermare la pulizia della stessa.

4. Campionamento e conservazione dei campioni

I campioni durante il trasporto dal luogo di prelievo al laboratorio devono essere conservati in condizioni refrigerate e anche durante lo stoccaggio in laboratorio prima dell'analisi.

5. Materiali e apparecchiature

5.1. Normale attrezzatura di laboratorio

Sia la vetreria che i contenitori impiegati nel corso della determinazione devono essere sottoposti ad un trattamento preliminare in modo da rimuovere eventuali tracce di VOC.

Lavare tutta la vetreria con un detergente e risciacquarla abbondantemente con acqua (6.1.1.) e successivamente con acqua ultrapura (6.1.2). Asciugare i contenitori riscaldandoli in stufa ad una temperatura compresa tra 150°C e 200°C per almeno 2-3 ore.

Al fine di evitare operazioni di pulizia che possono risultare non completamente efficienti, si sconsiglia l'uso di attrezzatura precedentemente impiegata per il trattamento e la conservazione di matrici particolarmente complesse (acque reflue, fanghi, suoli, alimenti, ecc.). È consigliabile l'uso di *vial* e tappi sempre nuovi.

5.2. Bottiglie

Si raccomanda l'uso di bottiglie in vetro con tappo a vite di capacità almeno pari a 100 mL

5.3. *Vial* (flaconcini) in vetro, setti in gomma, ghiera metalliche, pinza tappatrice o tappi a vite con setti in ptfe/silicone

Per il prelievo del campione e l'analisi utilizzare *vial* per spazio di testa a tenuta di gas, (consigliati da 20 mL) con chiusura tramite setti monouso in gomma siliconica teflonata e chiusura ermetica tramite ghiera metalliche e pinza stringi-ghiera o tappi a vite con setti in ptfe/silicone. Per la conservazione delle soluzioni di riferimento o di lavoro utilizzare *vial* con tappi a vite e setti in gomma siliconica teflonata.

Trattare i contenitori come descritto in (5.1).

5.4. Micropipette e microsiringhe

Micropipette tarate a volume variabile e microsiringhe di vetro tarate, lavate accuratamente con metanolo (6.2) sono utilizzate per il prelievo quantitativo del campione da sottoporre ad analisi e per la preparazione delle soluzioni di riferimento. Controllare periodicamente l'esattezza e la precisione delle microsiringhe e micropipette utilizzate, pesando su bilancia analitica aliquote note di acqua prelevate con tali dispositivi.

5.5. Stufa

Stufa munita di termostato capace di mantenere costante la temperatura prefissata entro l'ambito di $\pm 20^{\circ}\text{C}$, utilizzata per il trattamento della vetreria.

5.6. Strumentazione analitica e accessori

- (5.6.1) Sistema autocampionatore per fibre SPME;
- (5.6.2) Gascromatografo con analizzatore a spettrometria di massa tandem;
- (5.6.3) Colonna cromatografica capillare in silice fusa indicata per l'analisi dei PCB;
- (5.6.4) Fibra SPME in silice fusa rivestita di polidimetilsilossano (PDMS) spessore $30\ \mu\text{m}$;
- (5.6.5) Sistema di acquisizione ed elaborazione dati;
- (5.6.6) Gas di trasporto (elio o idrogeno). Utilizzare gas di elevata purezza filtrati attraverso una trappola a carbone attivo e, eventualmente, una a setacci molecolari; può rendersi necessaria anche l'eliminazione di tracce di ossigeno mediante opportuna trappola.

5.7. Frigorifero e congelatore

I campioni in attesa di analisi vengono conservati a temperatura refrigerata. Le soluzioni di riferimento vengono conservate in congelatore a -20°C , o come indicato dalla ditta fornitrice.

6. Reagenti e materiali di riferimento

In generale tutti i reagenti devono essere di grado analitico e con qualifiche speciali per gascromatografia. Si consiglia di controllare la purezza di ogni partita prima dell'impiego.

6.1. Acqua

- (6.1.1) Per il risciacquo preliminare della vetreria potrà essere usata acqua ottenuta dalla deionizzazione o dalla distillazione di quella potabile;
- (6.1.2) Per la preparazione dei reagenti e delle soluzioni di riferimento nonché per il risciacquo finale della vetreria dovrà essere usata acqua ultrapura esente da PCB (es, acqua milliQ).

6.2. Metanolo

Utilizzare un prodotto ultrapuro dopo aver verificato l'assenza di impurezze che interferiscono con la determinazione in oggetto.

6.3. Miscela standard PCB

Utilizzare un prodotto di elevata purezza, certificata, per la preparazione delle soluzioni di taratura. Al fine di evitare fenomeni di contaminazione incrociata, è opportuno conservare tali prodotti in un ambiente separato da quello dei campioni e al riparo dalla luce.

6.4. Miscela per Standard interno ¹³C-PCB

L'utilizzo di uno standard interno consente di eliminare gli errori dovuti alle fluttuazioni della quantità iniettata. Affinché un determinato composto possa essere utilizzato come standard interno deve: avere un comportamento chimico-fisico simile alla sostanza in esame, non essere presente nei campioni reali, essere stabile e inerte nei confronti dei composti da determinare, dare una risposta all'analizzatore impiegato, avere un tempo di ritenzione compreso nell'intervallo dei tempi di ritenzione dei composti da determinare, essere risolto gascromatograficamente rispetto alle sostanze da determinare. Per questo motivo si utilizza il metodo della diluizione isotopica mediante miscela di PCB marcati ¹³C contenete congeneri con differenti numeri di atomi di cloro, ad esempio "¹³C Labeled PCB MIX (EC4058 CIL)" che contiene i seguenti congeneri marcati ¹³C: #28, #52, #101, #138, #153, #180 e #209. Utilizzare prodotti di elevata purezza, certificata, per la preparazione delle soluzioni di riferimento interno.

6.5. Soluzioni di riferimento

- (6.5.1) Soluzione primaria di riferimento di PCB (10 µg/mL): la soluzione primaria di riferimento è costituita da una soluzione commerciale a titolo noto, certificata, della miscela dei composti in esame (mix WHO/ISS contenente 32 congeneri). La scadenza del materiale di riferimento è riportata sul certificato;
- (6.5.2) Soluzione primaria di riferimento dello standard interno marcato ¹³C-PCB (5,0 µg/mL): La soluzione primaria di riferimento è costituita da una soluzione commerciale a titolo noto, certificata, della miscela degli isotopi marcati ¹³C di alcuni composti in esame. La scadenza del materiale di riferimento è riportata sul certificato;
- (6.5.3) Soluzione secondaria di riferimento di PCB (1,0 µg/mL): In una *vial* da 1,0 mL prelevare con una microsiringa 100 µL della soluzione primaria di riferimento 6.5.1 e portare a 1,0 mL con metanolo. Questa soluzione va preparata al momento dell'uso;
- (6.5.4) Soluzione secondaria di riferimento contenente lo standard interno marcato ¹³C-PCB (0,5 µg/mL): In una *vial* da 1,0 mL prelevare con una microsiringa 100 µL della soluzione primaria di riferimento 6.5.2 e portare a 1,0 mL con metanolo. Questa soluzione va preparata al momento dell'uso;
- (6.5.5) Soluzione di lavoro contenente lo standard interno marcato (0,1 µg/mL): in una *vial* da 1,0 mL prelevare con una microsiringa 200 µL della soluzione primaria di riferimento 6.5.4 e portare a 1,0 mL con metanolo. Questa soluzione va preparata al momento dell'uso;
- (6.5.6) Soluzioni di lavoro per la taratura strumentale: Dalla soluzione concentrata di standard di riferimento 6.5.3 si preparano le soluzioni standard di riferimento, diluite in metanolo, riportate in Tabella 1. Per ciascun livello di taratura, 1 µL della soluzione standard di riferimento viene aggiunto a 10 mL di acqua; si ottengono così le concentrazioni riportate nell'ultima colonna della Tabella. In tutte le *vial* viene, inoltre, aggiunto 1 µL di soluzione di standard interno (0,1 µg/mL – soluzione 6.5.5); la concentrazione finale dello standard interno in 10 mL di acqua è 0,01 µg/L per ogni composto.

Per ciascun livello di taratura si consiglia di eseguire 3 ripetizioni su tre *vial* distinte.

Si consiglia di preparare una nuova retta di taratura almeno una volta al mese e di utilizzare nuovi standard di riferimento diluiti ad ogni sessione analitica.

Prima di preparare le soluzioni standard per la retta di taratura controllare la purezza del metanolo effettuando un'analisi di un bianco: 10 mL di acqua con aggiunto 1 µL di metanolo.

Nella Tabella 1 è riportato un esempio di preparazione della retta di taratura.

Tabella 1. Schema di preparazione curva di calibrazione

Livelli di taratura	Standard di riferimento diluiti ($\mu\text{g/mL}$)	Prelievi per diluizioni (μL)	Volume di metanolo da aggiungere (μL)	Standard in 10 mL di acqua (ng/L)
9	0,5	100 μL sol. 6.5.3 (1 $\mu\text{g/L}$)	100	50
8	0,2	100 μL sol. 6.5.3 (1 $\mu\text{g/L}$)	400	20
7	0,1	100 μL sol. secondaria di riferimento 6.5.3 (1 $\mu\text{g/L}$)	900	10
6	0,05	100 μL sol. <i>livello di taratura 6</i> (0,1 $\mu\text{g/L}$)	100	5
5	0,02	100 μL sol. <i>livello di taratura 6</i> (0,1 $\mu\text{g/L}$)	400	2
4	0,01	100 μL sol. <i>livello di taratura 6</i> (0,1 $\mu\text{g/L}$)	900	1
3	0,005	100 μL sol. <i>livello di taratura 3</i> (0,01 $\mu\text{g/L}$)	100	0,5
2	0,002	100 μL sol. <i>livello di taratura 3</i> (0,01 $\mu\text{g/L}$)	400	0,2
1	0,001	100 μL sol. <i>livello di taratura 3</i> (0,01 $\mu\text{g/L}$)	900	0,1

7. Procedura di misura

7.1. Operazioni preliminari

Predisporre il sistema (autocampionatore, gascromatografo con analizzatore a spettrometria di massa, sistema di acquisizione ed elaborazione dati) al funzionamento seguendo le indicazioni descritte nei manuali forniti dalle case costruttrici, settando i parametri di funzionamento in modo da ottimizzare le condizioni operative in funzione del dispositivo utilizzato.

7.2. Preparazione dei campioni

Nel caso il prelievo sia stato effettuato nelle bottiglie da 100 mL (5.2) occorre trasferire il campione negli appositi *vial* per spazio di testa. Estrarre le bottiglie dal frigorifero, attendere il raggiungimento della temperatura ambiente.

In una *vial* da 20 mL trasferire 10 mL di acqua in esame e aggiungere 1 μL di IS (13C12-PCB: 28L/52L/101L/153L/138L/180L) 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (10 ppt sol finale).

7.3. Taratura

Analizzare ciascuna soluzione di lavoro (6.5.6) applicando il procedimento di seguito descritto.

Dopo aver predisposto la strumentazione secondo le modalità operative prescelte, introdurre i *vial* contenenti le soluzioni di taratura nell'autocampionatore del sistema spazio di testa, seguendo l'ordine di analisi di concentrazioni crescente, ponendo un bianco di controllo subito dopo la

soluzione più concentrata al fine di valutare la possibilità di effetto memoria del sistema. Le condizioni di lavoro possono essere ottimizzate in funzione della strumentazione disponibile e della matrice analizzata intervenendo su alcune variabili strumentali: in Tabella 2 sono indicate, a titolo esemplificativo, le condizioni di lavoro tipiche.

Tabella 2. Analisi mediante auto SPME-HS-GC-MSMS: esemplificazione delle condizioni operative

Parametro operativo	Valore/Settaggio
Condizioni di campionamento con SPME	
Fibra SPME: PDMS	30 µm
Tempo di equilibrio	5 min
Tempo di campionamento	15 min
Temperatura di campionamento	90°C
Parametri di massa	
Ion Source	260°C
MS Transfer line	300°C
El+	70eV
Acquisition Mode	MRM (rif. Tabella 3)
Parametri del GC	
Colonna	Rxi-17SilMS 10 mt. X 0,15 mm ID X 0,15 µm (FAST GC)
Temperatura colonna iniziale	40°C
Temperatura iniettore	280°C
Modalità di iniezione	Splitless
Tempo di desorbimento del SPME nell'iniettore	2,5 min
Pressione	150,4 KPa
Flusso in colonna	1,08 mL/min
Velocità lineare	65,0 cm/s
Flusso purge	3,0 mL/min
Split ratio	10:1
Gas di trasporto	Helium
Programma Temperatura	40°C per 1 min (50°C/min) 170°C (10°C/min) 260° (50°C/min) 310°C

Utilizzando software strumentali in dotazione è possibile effettuare la registrazione, il trattamento dei dati analitici, la costruzione delle curve di taratura, l'elaborazione dei dati dei campioni incogniti e l'emissione dei risultati in modo automatizzato.

Date le caratteristiche dinamiche della tecnica strumentale utilizzata è difficile che la risposta strumentale si mantenga costante nel tempo. Si rende necessario verificare ad ogni sessione analitica la validità della curva di taratura per mezzo di una o più soluzioni di controllo, preparate con miscele di standards non utilizzate per la preparazione della curva, comprendendo sempre una concentrazione pari al LOQ e una seconda concentrazione compresa nel campo di applicazione. Si consiglia come criterio di accettabilità uno scostamento della concentrazione degli analiti non superiore al 20% dal valore nominale. In caso contrario procedere alla costruzione di una nuova curva di taratura e valutare le possibili cause dello scostamento rilevato.

7.4. Controllo del bianco

Ad ogni sessione di analisi è necessario controllare la qualità dell'ambiente di lavoro e dei reagenti impiegati sottoponendo un'aliquota di acqua (6.1.2) all'intero processo analitico nelle stesse condizioni sperimentali adottate durante l'analisi dei campioni e delle soluzioni di lavoro.

Se le concentrazioni dei congeneri dei PCB nel bianco sono superiori al livello minimo di quantificazione, è necessario individuare ed eliminare la causa di contaminazione prima di riprendere le determinazioni analitiche. Generalmente la verifica del bianco viene effettuata ad ogni inizio di sequenza delle analisi e immediatamente dopo l'analisi delle soluzioni di taratura e/o controllo.

7.5. Dosaggio del campione

Eeguire l'analisi dei campioni seguendo la procedura (7.2) e applicando le stesse condizioni operative utilizzate per la costruzione delle curve di taratura.

Identificare i congeneri dei PCB presenti nel campione ricercando le transizioni MRM degli ioni *target* e *qualifier* riportate nella Tabella 3 e ai tempi di ritenzione corrispondenti ai picchi degli standard.

Tabella 3. Transizioni MRM per congenere ricercato

Congenere	Target m/z	CE	Qualifier m/z	CE
#18	256,00>186,00	24	258,00>186,00	24
#28+#31	256,00>186,00	24	258,00>186,00	24
#28 IS	268,00>198,10	26	//	//
#52 IS	302,00>232,00	28	//	//
#52	289,90>219,90	24	291,90>221,90	24
#44	289,90>219,90	24	291,90>221,90	24
#95	323,90>253,90	24	325,90>255,90	24
#101 IS	335,90>266,00	28	//	//
#101	323,90>253,90	24	325,90>255,90	24
#99	323,90>253,90	24	325,90>255,90	24
#81	289,90>219,90	24	291,90>221,90	24
#110	323,90>253,90	24	325,90>255,90	24
#151	359,90>289,90	24	357,90>287,90	24
#77	289,90>219,90	24	291,90>221,90	24
#123	323,90>253,90	24	325,90>255,90	24
#149	359,90>289,90	24	357,90>287,90	24
#118	323,90>253,90	24	325,90>255,90	24
#146	359,90>289,90	24	357,90>287,90	24
#153 IS	371,90>301,90	28	//	//
#153	359,90>289,90	24	357,90>287,90	24
#114	323,90>253,90	24	325,90>255,90	24
#105	323,90>253,90	24	325,90>255,90	24
#138 IS	371,90>301,90	28	//	//
#138	359,90>289,90	24	357,90>287,90	24
#187	393,90>323,80	30	391,90>321,90	30
#183	393,90>323,80	30	391,90>321,90	30
#126	325,90>255,90	24	323,90>253,90	24
#128	359,90>289,90	24	357,90>287,90	24
#167	359,90>289,90	24	357,90>287,90	24
#177	393,90>323,80	30	391,90>321,90	30
#156	359,90>289,90	24	357,90>287,90	24
#180 IS	407,80>337,90	30	//	//
#180	393,90>323,80	30	391,90>321,90	30
#157	359,90>289,90	24	357,90>287,90	24
#169	359,90>289,90	24	357,90>287,90	24
#170	393,90>323,80	30	391,90>321,90	30
#189	393,90>323,80	30	391,90>321,90	30

Note: CE: Collision Energy

8. Calcolo ed espressione del risultato

8.1. Calcolo della concentrazione

Dai valori delle aree dei picchi cromatografici calcolare la concentrazione dei composti identificati utilizzando le curve di taratura (7.3).

Accertarsi che la concentrazione del campione cada all'interno dell'intervallo di taratura. Qualora le concentrazioni degli analiti risultino superiori a tale intervallo, conviene adattare fin quanto possibile la curva di taratura utilizzando soluzioni di lavoro (6.5.6.) al cui interno possa essere compreso il risultato ottenuto, ricorrendo alla diluizione del campione solo nei casi di necessità.

In caso di diluizione, moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

8.2. Espressione dei risultati

La concentrazione dei congeneri dei PCB nel campione va espressa in accordo con la normativa vigente.

9. Prestazioni del metodo

Le caratteristiche di prestazione del metodo (esattezza e precisione, stimate al valore di parametro, e limite di rivelabilità e incertezza estesa) sulla base del confronto di dati acquisiti in prove intralaboratorio, soddisfano i requisiti riportati nel punto 2.1 allegato III del DL.vo 2 febbraio 2001, n. 31. Lo studio di validazione è stato condotto utilizzando uno standard con 32 congeneri Mix WHO/ISS in acqua minerale a due livelli di concentrazione: 2,0 ng/L e 10,0 ng/L.

È stata inoltre valutata la robustezza del metodo contaminando con un materiale certificato tre diversi tipi di acque naturali: un campione di acqua minerale con ossidabilità < 0,5 mg/L di O₂; un campione di acqua sotterranea con ossidabilità 4,8 mg/L di O₂ e un campione di acqua termale solfurea con ossidabilità 17,0 mg/L di O₂. I risultati ottenuti erano tutti conformi ($z\text{-score} \leq 1,5$).

L'incertezza è stata calcolata con il metodo metrologico considerando i contributi della retta di taratura, della ripetibilità e del materiale di riferimento.

Le prestazioni del metodo sono riportate nelle Tabelle 4 e 5.

Tabella 4 livello di concentrazione a 2,0 ng/L

N° CI	IS	PCB	media	Sr	CV%	R%	LOD	LOQ	U _e %
3		#18	2,02	0,09	4	101	1,0	2,0	23
3	#28 IS	#28+#31	3,95	0,14	4	99	1,0	2,0	57
4	#52 IS	#52	1,95	0,05	3	98	1,0	2,0	28
4		#44	1,99	0,07	3	99	1,0	2,0	21
5		#95	2,01	0,06	3	101	1,0	2,0	18
5	#101 IS	#101	2,01	0,06	3	100	1,0	2,0	24
5		#99	1,98	0,06	3	99	1,0	2,0	29
4		#81	2,01	0,10	5	101	1,0	2,0	28
5		#110	2,06	0,09	4	103	1,0	2,0	17
6		#151	2,05	0,05	2	103	1,0	2,0	16
4		#77	2,06	0,09	4	103	1,0	2,0	20
5		#123	1,98	0,06	3	99	1,0	2,0	23
6		#149	2,02	0,06	3	101	1,0	2,0	28

N° CI	IS	PCB	media	Sr	CV%	R%	LOD	LOQ	Ue%
5		#118	2,02	0,07	4	101	1,0	2,0	22
6		#146	1,99	0,06	3	100	1,0	2,0	22
6	#153 IS	#153	2,01	0,06	3	100	1,0	2,0	20
5		#114	2,07	0,06	3	104	1,0	2,0	16
5		#105	2,05	0,07	4	102	1,0	2,0	15
6	#138 IS	#138	2,02	0,06	3	101	1,0	2,0	20
7		#187	1,96	0,08	4	98	1,0	2,0	37
7		#183	1,96	0,08	4	98	1,0	2,0	37
5		#126	2,05	0,10	5	102	1,0	2,0	23
6		#128	2,05	0,05	3	102	1,0	2,0	22
6		#167	2,08	0,07	4	104	1,0	2,0	31
7		#177	2,00	0,06	3	100	1,0	2,0	24
6		#156	2,10	0,06	3	105	1,0	2,0	30
7	#180 IS	#180	2,02	0,07	4	101	1,0	2,0	21
6		#157	2,09	0,08	4	105	1,0	2,0	30
6		#169	2,11	0,11	5	105	1,0	2,0	57
7		#170	2,03	0,07	3	101	1,0	2,0	20
7		#189	2,07	0,08	4	103	1,0	2,0	34

Note: IS: Standard Interno (Internal Standard); S_r: Scarto Tipo di Ripetibilità; CV: Coefficiente di Variazione; R: Recupero; LOD: Limite di rivelabilità (Limit of Detection); LOQ: Limite di Quantificazione (Limit Of Quantification); Ue: Incertezza estesa

Tabella 5 livello di concentrazione a 10,0 ng/L

N° CI	IS	PCB	media	S _r	CV%	R%	LOD	LOQ	Ue%
3		#18	9,79	0,41	4	98	1,0	2,0	5
3	#28 IS	#28+#31	19,46	0,74	4	97	1,0	2,0	12
4	#52 IS	#52	9,78	0,27	3	98	1,0	2,0	5
4		#44	9,50	0,35	4	95	1,0	2,0	5
5		#95	9,73	0,40	4	97	1,0	2,0	5
5	#101 IS	#101	9,76	0,41	4	98	1,0	2,0	5
5		#99	9,89	0,42	4	99	1,0	2,0	6
4		#81	9,65	0,39	4	97	1,0	2,0	6
5		#110	9,43	0,42	4	94	1,0	2,0	5
6		#151	9,59	0,35	4	96	1,0	2,0	4
4		#77	9,53	0,43	5	95	1,0	2,0	5
5		#123	9,96	0,47	5	100	1,0	2,0	6
6		#149	9,57	0,48	5	96	1,0	2,0	6
5		#118	9,85	0,43	4	98	1,0	2,0	5
6		#146	9,73	0,44	4	97	1,0	2,0	5
6	#153 IS	#153	9,87	0,44	4	99	1,0	2,0	5
5		#114	9,80	0,36	4	98	1,0	2,0	4
5		#105	9,87	0,41	4	99	1,0	2,0	4
6	#138 IS	#138	9,87	0,39	4	99	1,0	2,0	5
7		#187	9,87	0,46	5	99	1,0	2,0	8
7		#183	9,90	0,47	5	99	1,0	2,0	8
5		#126	9,59	0,46	5	96	1,0	2,0	6
6		#128	10,11	0,47	5	101	1,0	2,0	5
6		#167	9,53	0,39	4	95	1,0	2,0	7
7		#177	9,66	0,39	4	97	1,0	2,0	6
6		#156	9,79	0,44	4	98	1,0	2,0	7
7	#180 IS	#180	9,90	0,38	4	99	1,0	2,0	5
6		#157	9,71	0,40	4	97	1,0	2,0	7
6		#169	9,33	0,46	5	93	1,0	2,0	12
7		#170	9,69	0,33	3	97	1,0	2,0	5
7		#189	9,68	0,42	4	97	1,0	2,0	7

Note: IS: Standard Interno (Internal Standard); S_r: Scarto Tipo di Ripetibilità; CV: Coefficiente di Variazione; R: Recupero; LOD: Limite di rivelabilità (Limit of Detection); LOQ: Limite di Quantificazione (Limit Of Quantification); Ue: Incertezza estesa

Bibliografia

- Italia. Decreto Ministero della salute 10 febbraio 2015: Criteri di valutazione delle caratteristiche delle acque minerali naturali; GU Serie Generale 50 del 02/03/2015. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 50, 2 marzo 2015.
- Pawliszyn J (Ed.) *Handbook of solid phase microextraction*; Chemical Industry Press of China, 2009.
- U.S. Environmental Protection Agency. *Method 1668 rev.A Chlorinated Biphenyl congeners in water, soil, sediment, biosolids and tissue by HRGC-HRMS*. Washington DC: August 2003.
- U.S. Environmental Protection Agency. *Method 8270E Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry*; Environmental Protection Agency. Washington DC: February 2017.

ISS.CBA.049.REV00**GLIFOSATO, GLUFOSINATO E AMPA: METODO IN DERIVATIZZAZIONE CON FMOC-CL, SEPARAZIONE CON LC-HRMS E IN LC-MSMS****0. Generalità e introduzione**

Il glifosato (N-(phosphonomethyl) glycine) è un erbicida a largo spettro, non selettivo mentre l'AMPA (AminoMethylPhosphonic Acid) è il suo principale prodotto di degradazione nei vegetali, nel terreno e nelle acque.

Il glifosato, nell'ambiente, è degradato dai batteri principalmente ad AMPA e ad anidride carbonica. L'AMPA è ancora microbiologicamente degradabile con nuova liberazione di anidride carbonica. La degradazione avviene più rapidamente in condizioni aerobiche anziché anaerobiche. Il tempo di emivita nel terreno varia da alcuni giorni a diversi mesi; nell'acqua è stato misurato tra 12 ore e 7 giorni. Nell'uomo invece, il glifosato assorbito, viene escreto quasi completamente nella sua forma immodificata tramite le urine. Va evidenziato che non ci sono registrazioni per l'impiego diretto del glifosato alle acque. Il glifosato può essere introdotto nell'ambiente idrico attraverso la fuoriuscita, lo scarico accidentale o lo smaltimento dei rifiuti durante la produzione, lo stoccaggio e l'uso. Quando è applicato secondo le istruzioni riportate sull'etichetta, il glifosato raramente raggiunge le fonti d'acqua direttamente. La bassa tensione di vapore del glifosato suggerisce che non è probabile che si verifichi la perdita per evaporazione. L'etichetta del produttore consiglia agli utenti di non applicare alcuna formulazione a base di glifosato a uno specchio d'acqua. Pertanto, l'ingresso in acqua può avvenire attraverso lo spostamento involontario fuori sede di spray diserbante ovvero per deriva durante l'applicazione.

Il glifosato è lavato via dal fogliame della pianta dalla pioggia, secondo l'entità delle precipitazioni e dal tempo trascorso dopo l'applicazione dell'erbicida.

A livello analitico, glifosato, AMPA e glufosinato (numero CAS e peso molecolare in Tabella 1) non possono essere inseriti nelle determinazioni multiresiduali applicate per il dosaggio di numerosi fitofarmaci perché sono sostanze polari; sono composti anfoteri, non volatili e privi di gruppi cromofori, sono in pratica insolubili nei solventi organici, ma molto solubili in acqua.

A causa di questi fattori, inserire nell'analisi di routine la determinazione di tali molecole a concentrazione di poche parti per trilione, richiede alla struttura laboratoristica, un rilevante sforzo quali-quantitativo in termini di apparecchiature, materiale e personale coinvolto.

Tabella 1. Sostanze attive

Sostanza attiva	numero CAS	PM
Glifosato	1071-83-6	169,1
AMPA	1066-51-9	111,0
Glufosinato	51276-47-2	181,13

1. Campo di applicazione

Il presente metodo di prova consente la determinazione di residui di glifosato, Acido aminometilfosfonico (AMPA) e glufosinato in campioni di acqua potabile e destinata al consumo umano, sotterranea e superficiale.

Il documento Sanco 825/00 rev 8.1 al paragrafo 6.3 riporta: “A condizione che un metodo sia stato validato con successo per le acque superficiali al LOQ richiesto per l’acqua potabile, non è necessaria alcuna ulteriore convalida nell’acqua potabile.”

Le eventuali particelle in sospensione presente nei campioni di acqua vengono rimosse dai campioni mediante filtrazione.

Il metodo è applicabile per valori di concentrazione a partire da 0,02 µg/L (limite di quantificazione).

2. Principio del metodo

Sinteticamente gli analiti glifosato e AMPA possono essere analizzati mediante derivatizzazione con FMOC-Cl e successiva analisi strumentale con:

- (2.1) Cromatografia liquida ad alta prestazione abbinata a spettrometria di massa ad alta risoluzione (HPLC-HRMS) e ionizzazione electrospray (ESI) positiva;
- (2.2) Cromatografia liquida ad alta o altissima prestazione (HPLC/UHPLC) abbinata a spettrometria di massa tandem (MSMS) a triplo quadrupolo e ionizzazione *electrospray* (ESI) negativa;

Il metodo prevede i seguenti step:

- Derivatizzazione degli analiti con Fluorenilmetilcloroformiato (FMOC-Cl),
- Stadio di purificazione su colonna di estrazione in fase solida (SPE) non in linea,
- Rilevazione e quantificazione degli analiti:
 - mediante diluizione isotopica previa aggiunta all’aliquota di saggio di una quantità nota di glifosato e AMPA isotopicamente arricchiti su almeno due atomi utilizzando la tecnica cromatografia liquida ad alta prestazione e spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) e ionizzazione electrospray (ESI) positiva.
 - mediante taratura con standard interno previa aggiunta all’aliquota di saggio di una quantità nota di glifosato e AMPA isotopicamente arricchiti su almeno due atomi utilizzando la tecnica cromatografia liquida ad alta o altissima prestazione e spettrometria di massa con triplo quadrupolo (MSMS) e ionizzazione electrospray (ESI) negativa

Il glufosinate, appartenente alla famiglia di aminofosfonato, può essere determinato simultaneamente agli altri analiti.

3. Interferenze e causa di errori

Tutta la vetreria utilizzata per l’analisi e il prelievo deve essere opportunamente pulita ed esente da tracce degli analiti.

I solventi e i reagenti devono essere di grado di purezza adeguata per l’analisi dei residui. Possono rappresentare una causa di interferenze alcune sostanze organiche coestratte insieme ai residui di prodotti fitosanitari, in modo particolare nel caso di acque superficiali.

Il Calcio e il Magnesio, ioni solitamente presenti in acque con durezza medio alta, potrebbero influire negativamente nelle determinazioni del glifosato e AMPA. Nel caso in cui il contenuto di ioni calcio e magnesio sia superiore a 3,2 mmoli/L, è necessaria una maggiore concentrazione di agente chelante EDTA sale sodico (norma ISO 16308, revisione 15.09.2014).

La presenza di cloro libero, ad esempio in acque destinate al consumo umano trattate, può causare perdite di glifosato mediante ossidazione, di conseguenza in fase di campionamento si consiglia l'impiego di tiosolfato di sodio.

4. Campionamento e conservazione dei campioni

Il campionamento e la successiva conservazione dei campioni avviene secondo la norma ISO 5667-3. I campioni vengono prelevati in recipienti in plastica e sono conservati in ambiente refrigerato. I tempi di conservazione, indicati in Tabella A1 della ISO 5667:2012, sono di 6 giorni se il campione viene refrigerato (4+/-2°C), mentre è di 1 mese se il campione viene congelato a temperatura pari o inferiore a -18°C. Qualora lo stato del campione sia congelato, prima di procedere alle operazioni analitiche, le aliquote di prova vengono scongelate mantenendole a temperatura ambiente per circa 24 ore. Per i campioni con sospetta presenza di contenere cloro libero, aggiungere circa 2 mg di tiosolfato di sodio (6.1.14) per 100 mL.

5. Apparecchiature

- (5.1) Bagno ad ultrasuoni;
- (5.2) Bilancia tecnica con sensibilità di 0,01 g;
- (5.3) Bilancia analitica con sensibilità di 0,1 mg;
- (5.4) Pompa a membrana KNF o equivalente;
- (5.5) Sistema di evaporazione. Sono consentiti evaporatori centrifughi ad es. Genevac, Turbovap o equivalenti nonché sistemi a corrente di azoto;
- (5.6) Sistema di eluizione automatico per colonne SPE Autotrace™ (o equivalenti) o sistema di eluizione manuale ad esempio Supelco Visiprep™ SPE Vacuum Manifold™ o equivalenti;
- (5.7) Sistema cromatografico ad alta prestazione con rivelazione a spettrometria di massa tandem (HPLC-MSMS) o a spettrometria di massa ad altissima risoluzione (HPLC-HRMS);
- (5.8) pHmetro (o cartina indicatrice di pH).

6. Reagenti e materiali

6.1. Reagenti

- (6.1.1) Acqua (grado LC-MS);
- (6.1.2) Isopropanolo (grado LC-MS);
- (6.1.3) Metanolo (grado LC-MS);

- (6.1.4) Acido formico (grado LC-MS);
- (6.1.5) Ammonio acetato (grado LC-MS);
- (6.1.6) Ammonio formiato (grado LC-MS);
- (6.1.7) Ammoniacca 37% (grado analitico);
- (6.1.8) Diclorometano (Residue analysis grade);
- (6.1.9) Sodio tetraborato p.a.;
- (6.1.10) Potassio idrossido p.a. (KOH);
- (6.1.11) Acido Cloridrico p.a. concentrato (HCl);
- (6.1.12) Fluorenilmetilcloroformiato puriss. p.a. (FMOC-Cl);
- (6.1.13) Sale tetrasodico di EDTA (Na_4EDTA , purezza $\geq 99\%$, peso molecolare = 380,2) o fiala *Normex* per preparazione di una soluzione di EDTA 0,1M;
- (6.1.14) Tiosolfato di sodio p.a.

6.2. Soluzioni

- (6.2.1) Soluzione HCl 6M: La soluzione deve essere preparata diluendo 50 mL di HCl concentrato con 50 mL di acqua;
- (6.2.2) Soluzione KOH 6M: deve essere preparata sciogliendo cautamente 33,7 g di KOH in 100 mL di acqua;
- (6.2.3) Soluzione FMOC-Cl 6,5 mM: La soluzione deve essere preparata giornalmente disciogliendo 168 mg di FMOC-Cl in 100 mL di acetonitrile;
- (6.2.4) Soluzione di Na_4EDTA : soluzione acquosa 1,0 M o 0,1 M. La soluzione a concentrazione maggiore viene utilizzata nel caso si esegua una purificazione (*clean-up*) del derivatizzato utilizzando un sistema manuale (5.6.). La soluzione a concentrazione minore viene utilizzata nel caso in cui lo stadio di purificazione venga eseguito con un sistema automatico:
 - (6.2.4.1) Soluzione di Na_4EDTA : 1,0 M, la soluzione viene preparata disciogliendo 38,2 g di Na_4EDTA in 100 mL di acqua,
 - (6.2.4.2) Soluzione di Na_4EDTA : 0,1 M, la soluzione viene preparata disciogliendo 3,82 g di Na_4EDTA in 100 mL di acqua, oppure diluendo in un matraccio da 1L una fiala *Normex* per la preparazione di una soluzione di EDTA 0,1M;
- (6.2.5) Tampone borato: 5% o 40 mM: La soluzione a maggiore concentrazione viene utilizzata nel caso si esegua una purificazione (*clean-up*) del derivatizzato utilizzando un sistema manuale (5.6.), conseguentemente, la soluzione a concentrazione minore viene utilizzata nel caso in cui lo stadio di purificazione venga eseguito con un sistema automatico:
 - (6.2.5.1) Tampone borato: 5%, la soluzione viene preparata disciogliendo 25 g di sodio tetraborato decaidrato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) in 500 mL di acqua,
 - (6.2.5.2) Tampone borato: 40 mM, la soluzione viene preparata disciogliendo 7.63 g di sodio tetraborato decaidrato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) in 500 mL di acqua. La dissoluzione del sale può essere attuata utilizzando un bagno ad ultrasuoni o un agitatore e scaldando, se necessario, fino alla temperatura di 50°C. La soluzione deve essere conservata refrigerata a 4°C e, se correttamente conservata, ha una validità di sei mesi dalla data di preparazione. Prima dell'utilizzo l'eventuale corpo di fondo presente deve essere completamente ridisciolti, ad esempio, ponendo la bottiglia contenente la soluzione in questione in un bagno ad ultrasuoni;
- (6.2.6) Soluzione di acetato di ammonio 5M (per il metodo al punto 2.2): deve essere preparata sciogliendo 38,5 g di acetato di ammonio in 100 mL di acqua. La soluzione rimane stabile 6 mesi se conservata refrigerata (+4°C).

6.3. Analisi HPLC-HRMS: eluenti

- (6.3.1) Fase eluente A: (Acqua, formiato di ammonio 5 mM, acido formico 0,01%, metanolo, 2%). In un matraccio o in un cilindro della capacità di 1000 mL, disciogliere 315 mg di formiato di ammonio in circa 20 mL di acqua, aggiungere 0,1 mL di acido formico e 20 mL di metanolo, quindi, portare a volume con acqua;
- (6.3.2) Fase eluente B: (Metanolo 83%, Isopropanolo 15%, Acqua 2% formiato di ammonio 5 mM, acido formico 0,01%) In un matraccio o in un cilindro della capacità di 1000 mL, disciogliere 315 mg di formiato di ammonio in circa 20 mL di acqua, aggiungere 0,1 mL di acido formico e 150 mL di isopropanolo, quindi, portare a volume con metanolo.

6.4. Analisi HPLC-MSMS: soluzioni accessorie

- (6.4.1) Soluzione HPLC acetato di ammonio 5mM pH 9: Fase eluente A: diluire 1/1000 in acqua la soluzione di acetato di ammonio 5M e con l'aiuto di un pHmetro portare il pH a $9,0 \pm 0,1$ con aggiunta di ammoniaca concentrata al 37%.
- (6.4.2) Soluzione HPLC: Fase eluente B: Metanolo
- (6.4.3) Soluzione di ricostituzione Analisi HPLC-HRMS: la soluzione di ricostituzione risulta identica all'eluente A del punto 6.3.1.
- (6.4.4) Soluzione lavaggio HPLC-MSMS: La soluzione deve essere preparata diluendo 50 mL di metanolo con 50 mL di acqua
- (6.4.5) Soluzione di ricostituzione HPLC-MSMS: miscelare 20 mL di fase eluente A con 20 mL di fase eluente B

6.5. Materiali di riferimento

- (6.5.1) Materiali di riferimento di glifosato, puro per analisi dei residui in tracce;
- (6.5.2) Materiali di riferimento di Acido aminometilfosfonico (AMPA), puro per analisi dei residui in tracce;
- (6.5.3) Materiali di riferimento di glufosinato di ammonio, puro per analisi dei residui in tracce;
- (6.5.4) Materiali di riferimento di $1,2\text{-}^{13}\text{C}2^{15}\text{N}$ glifosato. È possibile impiegare materiali di riferimento diversi purché si mantenga una marcatura minima ad un atomo di C e di N;
- (6.5.5) Materiali di riferimento di $^{13}\text{C}^{15}\text{ND}_2$ Acido aminometilfosfonico (AMPA). È possibile impiegare materiali di riferimento diversi purché si mantenga una marcatura minima ad un atomo di C e di N.

6.6. Soluzioni di materiali di riferimento

Tutte le soluzioni devono essere conservate in recipienti di polietilene o altro materiale plastico, congelate, alla temperatura di -18°C .

6.6.1. Soluzioni madre di materiali di riferimento:

Le soluzioni di conservazione devono avere una concentrazione di almeno 100 mg/L. La data di scadenza di tali soluzioni, se correttamente conservate, è di un anno dalla data di preparazione

o di apertura e, comunque, non può essere successiva alla data di scadenza stabilita dal produttore per il materiale originario.

6.6.2. Soluzioni intermedie di materiali di riferimento

Le soluzioni di conservazione intermedie devono avere una concentrazione di almeno 1 mg/L. La data di scadenza di tali soluzioni, se correttamente conservate, è di un mese dalla data di preparazione e, comunque, non può essere successiva alla data di scadenza stabilita dal produttore per il materiale originario.

6.6.3. Soluzioni di lavoro di materiali di riferimento

A partire dalle soluzioni di conservazione intermedie di cui al punto precedente si preparano giornalmente le soluzioni di lavoro con concentrazione pari a 0,1 mg/L. Diluendo tale soluzione nel caso del metodo 2.2 si ottengono gli standard di taratura.

6.6.4. Soluzione Mix di lavoro

0,1 mg/L in acqua di standard di glifosato e AMPA marcati.

6.7. Materiali

- (6.7.1) Cilindri di plastica con volume di 500 mL;
- (6.7.2) Contenitori a bocca larga in plastica con volume di almeno 250 mL;
- (6.7.3) *Vial* per cromatografia, in vetro o materiale plastico, dotati di riduzione interna da almeno da 0,3 mL compatibili con gli autocampionatori dei sistemi cromatografici utilizzati muniti di tappo a vite e setto teflonato;
- (6.7.4) Materiali per derivatizzazione con sistema di eluizione manuale:
 - (6.7.4.1) Filtri con attacco luer lock in cellulosa rigenerata con porosità pari a 0,2µm e a 0,45 µm,
 - (6.7.4.2) Filtri in carta tipo Whatman™ grado 1, (qualitativi, porosità 11 µm) o equivalenti,
 - (6.7.4.3) Colonne SPE Phenomenex Strata™ -X sorbent cartridges 33 µm, 200 mg o prodotto equivalente;
- (6.7.5) Materiali per derivatizzazione con sistema di eluizione automatica:
 - (6.7.5.1) Filtri con attacco *luer lock* in cellulosa rigenerata con porosità pari a 0,2µm e a 0,45 µm e filtri HV 0,45µm per siringa,
 - (6.7.5.2) Filtri in carta tipo Whatman™ grado 1, (qualitativi, porosità 11 µm) o equivalenti,
 - (6.7.5.3) Colonne SPE Oasis™ HLB cartridges 6 mL, 200 mg o prodotto equivalente;
- (6.7.6) Materiali per analisi HPLC-HRMS: colonna HPLC Phenomenex Gemini™ C18-NX, 150 mm, 2 mm, 3 µm o colonna C18 equivalente;
- (6.7.7) Materiali per analisi HPLC-MSMS: colonna HPLC (per il metodo al punto 3.2): Waters C18 BEH 50 x 2,1 mm 1,7µm o colonna C18 equivalente.

7. Procedure di estrazione, separazione e misura

Il procedimento analitico consta delle seguenti fasi: derivatizzazione, purificazione degli FMOC-derivati, separazione in cromatografia liquida ad alta prestazione e analisi in spettrometria di massa. L'intero procedimento si applica allo stesso modo sia per gli standard di taratura che per i campioni incogniti.

7.1. Derivatizzazione

Un'aliquota di prova (circa 100 mL) viene filtrata, se necessario, attraverso un filtro di carta o su filtri 0,45 µm quindi, 80 mL di filtrato limpido vengono trasferiti in un contenitore di plastica e acidificati a pH 1 tramite aggiunta di circa 1,6 mL di HCl 6 M.

Al fine di massimizzare la dissociazione dei possibili complessi analita-catione, l'aliquota viene agitata manualmente per un minuto e lasciata riposare per almeno un'ora.

Successivamente l'aliquota viene neutralizzata con circa 1,6 mL di una soluzione 6M di KOH, verificando il pH con pH metro o cartina indicatrice universale, e addizionata di 0,08 mL di soluzione mix di lavoro (6.6.4.) a 0,1 mg/L (glifosato e AMPA marcati). Tale addizione corrisponde alla introduzione di 8 ng di ciascuno dei due analiti isotopicamente arricchiti, per un valore di concentrazione nell'aliquota di prova di 0,1 µg/L.

L'aliquota così trattata viene ulteriormente addizionata di 10 mL di tampone borato al 5% e 10 mL di soluzione di FMOC-Cl (concentrazione FMOC-Cl nell'aliquota di 650 µM), agitata vigorosamente e lasciata a reagire per una notte. Trascorso tale periodo la reazione viene arrestata acidificando la soluzione circa a pH 3 tramite aggiunta di 1 mL di acido formico concentrato.

L'aliquota derivatizzata viene filtrata attraverso un filtro di carta tipo Whatman Grado 1 in una bottiglia di plastica o in cilindro di plastica, diluita con 100 mL con acqua e addizionata di 4 mL di soluzione Na₄EDTA 1M.

Si considera inoltre che:

- Per raggiungere sensibilità adeguate, la quantità di aliquota da saggio da sottoporre a derivatizzazione può essere raddoppiata. In tal caso, i volumi dei reattivi e la quantità di materiale di riferimento isotopicamente arricchito sono, di norma, aumentati di circa un fattore due;
- Utilizzando sistemi di purificazione automatica può essere considerato auspicabile ridurre la quantità di borato. Tale obiettivo può essere raggiunto addizionando l'aliquota da saggio da sottoporre a derivatizzazione (80 mL) di 10 mL di tampone borato 40 mM e portando il pH della soluzione ad un valore di 9 unità tramite aggiunta di KOH 6 M. Contestualmente, sempre nell'ottica di diminuire la possibile formazione di corpi insolubili nell'apparecchiatura, può essere utile aumentare la diluizione dell'aliquota derivatizzata filtrata (200 mL di acqua invece di 100) e diminuire la quantità di EDTA, utilizzando 4 mL di una soluzione 0,1 M invece della soluzione 1 M precedentemente detagliata.

7.2. Purificazione (*clean up*)

7.2.1. Purificazione su sistema di eluzione manuale (punto 5.6.)

Una colonna SPE (Phenomenex Strata-X sorbent cartridges 33 µm, 200 mg) viene installata in una posizione di un sistema Supelco Visiprep o equivalente precedentemente collegato ad una pompa a membrana.

Eseguite tali operazioni, la colonna viene condizionata eluendo sequenzialmente 5 mL di metanolo e successivamente 5 mL di una soluzione acquosa allo 0,1% di acido formico.

L'aliquota derivatizzata, filtrata, diluita e addizionata di Na₄EDTA viene quindi fatta passare attraverso la colonna SPE ad un flusso di circa 2,5 mL/min.

Al termine dell'eluizione l'acqua rimasta nella fase stazionaria viene rimossa tramite flusso forzato di aria o azoto per circa 30 minuti, al termine dei quali viene eseguito uno stadio di lavaggio con 2,5 mL di diclorometano e un successivo nuovo stadio di essiccamento con flusso d'aria o azoto per ulteriori 30 minuti.

Gli analiti vengono desorbiti dalla colonna tramite passaggio, attraverso la stessa, di 9 mL di metanolo avendo cura di raccogliere gli eluati in tubo di prova.

La soluzione metanolica viene quindi evaporata a secchezza tramite evaporatore centrifugo o in corrente di azoto e il residuo ridisciolti in 0,25 mL di soluzione di ricostituzione 6.4.3.

7.2.2. Purificazione con sistema di eluizione automatico per colonne SPE (5.6.)

Condizionare la colonna SPE Oasis HLB nell'estrattore automatico eluendo sequenzialmente 6 mL di metanolo e successivamente 6 mL di una soluzione acquosa allo 0,1% di acido formico.

L'aliquota derivatizzata, filtrata e diluita (7.1) viene quindi fatta passare attraverso la colonna SPE ad un flusso di circa 2,5 mL/min.

Al termine dell'eluizione l'acqua rimasta nella fase stazionaria viene rimossa tramite flusso forzato di aria o azoto per circa 30 minuti, al termine dei quali, viene eseguito uno stadio di lavaggio con 4 mL di diclorometano e un successivo nuovo stadio di essiccamento con flusso d'aria o azoto per ulteriori 30 minuti.

Gli analiti vengono desorbiti dalla colonna tramite passaggio, attraverso la stessa, di 10 mL di metanolo avendo cura di raccogliere gli eluati in tubo di prova.

La soluzione metanolica viene quindi evaporata a secchezza tramite evaporatore centrifugo o in corrente di azoto e il residuo ridisciolti in 0,25 mL di soluzione di ricostituzione (6.4.5.).

Se l'estratto risultasse torbido può essere filtrato su filtri HV 0,45 µm.

7.3. Analisi strumentale

7.3.1. Analisi mediante LC-HRMS

L'analisi strumentale viene effettuata mediante cromatografia liquida con analizzatore costituito da uno spettrometro di massa ad alta risoluzione e ionizzazione *electrospray* (ESI) positiva.

Nell'Allegato A1 vengono riportati i parametri strumentali e i parametri di acquisizione.

7.3.2. Analisi mediante LC-MSMS

L'analisi strumentale viene effettuata mediante cromatografia liquida con analizzatore costituito da uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo e ionizzazione *electrospray* (ESI) negativa.

Gli analiti derivatizzati vengono ricercati operando in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring).

Nell'Allegato A2 sono riportati i parametri strumentali e i parametri di acquisizione.

8. Calcolo ed espressione dei risultati

8.1. Analisi qualitativa

L'identificazione degli analiti avviene utilizzando diversi approcci, alcuni più immediati e applicabili con tutti gli analizzatori di massa.

Il Tempo di ritenzione (Tr) costituisce il criterio più semplice di riconoscimento dell'analita nel campione. Infatti il Tr deve corrispondere a quello dello standard di taratura all'interno di una determinata finestra dopo aver preso in considerazione il potere di risoluzione del sistema cromatografico, a parità di condizioni cromatografiche.

Il tempo di ritenzione corrisponde a quello medio degli standards con una tolleranza del $\pm 0,1$ min.

Con un analizzatore di massa si ha la conferma dell'identificazione dell'analita tramite i seguenti criteri:

- presenza di ioni specifici (almeno 2);
- verifica del rapporto tra le intensità degli ioni specifici dell'analita riscontrati nel campione e quelli dell'analita nella miscela standard di riferimento (o in un campione spiked ad una concentrazione comparabile), e misurati nelle stesse condizioni. Le tolleranze per i due rapporti devono essere in accordo con quelle della Tabella 2.

Tabella 2. Tolleranze massime consentite per intensità di ioni relative utilizzando una gamma di tecniche di spettrometria di massa

Rapporto ionico: ione meno intenso/più intenso	EI-GC-MS (relativa)	CI-GC-MS, GC-MSn, LC-MS, LC-MSn (relativa)
0,5-1,0	$\pm 10\%$	$\pm 30\%$
0,2-0,5	$\pm 15\%$	$\pm 30\%$
0,1-0,2	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
$\leq 0,10$	$\pm 50\%$	$\pm 30\%$

Gli analiti sono identificati e confermati quando è rilevato il picco relativo allo ione di quantificazione (Target) e/o almeno uno ione frammento.

Gli analiti sono identificati e confermati quando il rapporto di aree tra lo ione quantificatore (Q) e lo ione qualificatore (q) non si discosta più del 30% del medesimo rapporto ottenuto nella determinazione degli standard di taratura.

8.2. Analisi quantitativa

L'analisi quantitativa si basa sul confronto delle aree dei picchi di un composto presente in un campione con quelle di uno o più standard.

Ogni analita viene dosato quantitativamente in base al valore dell'area o dell'area relativa (rapporto tra quella del picco d'interesse e quella dello standard interno).

Per ogni analita da quantificare, da solo o in miscela, possono essere preparate soluzioni di taratura a concentrazione nota, ottenendo così una relazione che correla le aree con la quantità introdotta.

La taratura può essere effettuata su un unico livello, ad una concentrazione molto vicina a quella degli analiti da determinare quantitativamente oppure costruendo una curva di taratura multilivello.

9. Prestazioni del metodo

Il laboratorio dovrà verificare l'applicazione del metodo di prova prima di eseguire le analisi sui campioni.

Nell'Allegato A3 e nella tabella specifica riportata nella Parte C "Caratteristiche di prestazione dei metodi ISS" si riportano i risultati delle validazioni con l'utilizzo delle tecniche di cui al paragrafo 2.

Bibliografia

- Brønstad JO, Friestad HO. Behaviour of glyphosate in the aquatic environment. In: Grossbard E, Atkinson D (Ed.). *The herbicide glyphosate*. London: Butterworths; 1985. p. 200-205.
- Canadian Council of Ministers of the Environment. *Scientific criteria document for the development of the Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life-glyphosate*. Winnipeg: CCME; 2012
- Direzione generale della Salute e della sicurezza alimentare della Commissione europea *SANCO/12571/19 Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. Bruxelles: DG SANV; 2019
- Direzione generale della Salute e della sicurezza alimentare della Commissione europea. *SANCO/825/00 rev. 8.1, Guidance document on pesticide residue analytical methods*. Bruxelles: DG SANV; 2010
- Europa. 2002/657/CE: Decisione della Commissione, del 12 agosto 2002, che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* n. L 221 del 17/08/2002.
- Europa. Direttiva 2009/90/CE del 31 luglio 2009 che stabilisce, conformemente alla direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, specifiche tecniche per l'analisi chimica e il monitoraggio dello stato delle acque". *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*, L 201 del 01.08.2009
- Goldsborough LG, Beck AE, (1989). *Rapid dissipation of glyphosate in small forest ponds*. Archives of Environmental Contamination and toxicology. 18 : 537-544.
- Hanke I, Singer H, Hollender J. Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glyphosate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection. *Anal Bioanal Chem* 2008; 391(6):2265-76.
- International Agency for Research on Cancer. *Glyphosate*. Lyon: IARC; 2015 Monographs Volume 112
- ISO 16308 First edition 15.09.2014. *Water quality, determination of glyphosate and Ampa, method using high performance liquid chromatography (HPLC) with tandem mass spectrometric detection*. Geneva: International Organization for Standardization; 2014.
- ISO 3696:1996. *Acqua di qualità analitica - Specifiche e metodi di prova*. Geneva: International Organization for Standardization; 1996.
- ISO 5667-3:2018. *Qualità dell'acqua-Campionamento - Parte 3: conservazione e manipolazione dei campioni di acqua*. Geneva: International Organization for Standardization; 2018.
- ISO 8466-1:1990. *Qualità dell'acqua - Taratura e valutazione dei metodi di analisi e stima delle prestazioni caratteristiche - Parte 1: Valutazione statistica della funzione di taratura lineare*. Geneva: International Organization for Standardization; 1990.
- Italia. Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della Direttiva 98/83/Ce relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 52, 3 marzo 2001.

Italia. Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152 e s.m.i: “Norme in materia ambientale”. *Gazzetta Ufficiale* – *Serie Generale* n. 88, 14 aprile 2006.

Italia. Decreto Ministero della Salute del 6 luglio 2017: “Proroga dell’entrata in vigore del decreto 14 novembre 2016, recante: «Modifiche all’allegato I del decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31, recante: "Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano". *Gazzetta Ufficiale* – *Serie Generale* n. 268, 15 ottobre 1999

Meyer MT, Loftin KA, Lee EA., Hinshaw GH, Dietze JE, Scribner EA. *Determination of glyphosate, its degradation product aminomethylphosphonic acid, and glufosinate, in water by isotope dilution and online Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry*. Reston,VA: U.S. Geological Survey; 2009.

Allegati al metodo ISS.CBA.049.rev.00

A1. Condizioni strumentali LC-HRMS (Thermo Accela 1250/Orbitrap Exactive)

Principali parametri cromatografici

Parametro operativo	Valore/Settaggio
Colonna	Phenomenex Kinetex bifenil 100 mm, 3 mm, 2,6 µm
Temperatura colonna	35°C
Fase eluente A	Acqua, formiato di ammonio 5 mM, acido formico 0,01%, metanolo, 2%
Fase eluente B	Metanolo 83%, Isopropanolo 15%, Acqua 2% formiato di ammonio 5 mM, acido formico 0,01%
Volume di iniezione	50 µL

Principali parametri cromatografici: gradiente LC

Tempo (minuti)	Percentuale Fase eluente A	Percentuale Fase eluente B	Flusso (µL/min)
0	90	10	400
1	90	10	400
20	5	95	400
25	5	95	400
27	90	10	400
32	90	10	400

Principali parametri di acquisizione

Parametro operativo	Event 1	Event 2
	Valore/Settaggio	Valore/Settaggio
Polarity	positive	positive
Resolution	High (50000)	High (50000)
ACG Tgt	Balanced	Balanced
Max injection time	100 msec	100 msec
Fragmentation	off	on
HCD	none	15 eV
Lock mass	on, (m/z=391,28429)	off
Scan range	300-450	100-400

Ioni caratteristici (molecolari protonati): modalità di ionizzazione positiva

Analita	Formula ione	Ione quantificatore: (Target: Tgt) (m/z)	Ione qualificatore (Qualifier: Qual) (m/z)
Glifosato-FMOC	C ₁₈ H ₂₀ PNO ₇	392,08936	393,09272
1,2- ¹³ C ₂ ¹⁵ N glifosato -FMOC	¹³ C ₁₈ H ₂₀ P ¹⁵ NO ₇	395,09311	396,09646
AMPA-FMOC	C ₁₆ H ₁₈ PNO ₅	334,08389	335,08724
¹³ C ¹⁵ ND ₂ AMPA-FMOC	¹³ C ₁₅ D ₂ H ₁₆ P ¹⁵ NO ₅	338,09683	339,10018

Il sistema spettrometrico utilizzato (Thermo Orbitrap Exactive), se correttamente calibrato, consente, nelle condizioni d'uso (Enhanced) di operare, in modalità di frammentazione, con una esattezza di massa di 5 ppm e una risoluzione di 50000. In maniera similare a quanto riportato per la modalità di scansione completa (full scan), le masse degli ioni frammento degli analiti, generati in HCD a 15 eV, saranno ricercate con otto cifre significative (cinque cifre decimali) ma, se richiesto, riportate con sei cifre significative (tre cifre decimali).

Principali ioni frammento (HCD 15 eV)

Analita	Ione (m/z)	Ione (m/z)	Ione (m/z)
Glifosato-FMOC	392,08936	214,01111	170,02129
1,2- ¹³ C ₂ ¹⁵ N glifosato -FMOC	395,09311	217,01486	173,02503
AMPA-FMOC	334,08389	156,00564	112,01581
¹³ C ¹⁵ ND ₂ AMPA-FMOC	338,09683	160,01858	116,02875

A2. Condizioni strumentali LC-MSMS**Principali parametri cromatografici**

Parametro operativo	Valore/Setting
Colonna	Waters C18 BEH 50 x 2,1 mm 1,7µm
Temperatura colonna	30°C
Fase eluente A	Acetato di ammonio 5mM portato a pH=9 con ammoniaca concentrata
Fase eluente B	Metanolo
Volume di iniezione	10 µL

Principali parametri spettrometrici

Parametro operativo	Valore/Setting
Polarity	Negative
MRM Detection Window	180 s
Target Scan Time	0,5s
Curtain Gas (CUR)	25
Collision Gas (CAD)	medium
Ion Source Gas 1 (GS1)	35
Ion Source Gas 2 (GS2)	45
Capillary temperature (TEM)	400 °C
Ion Spray Voltage (ISV)	-4500
Collision Exit Potential (CXP)	2

Principali parametri cromatografici. Gradiente LC

Tempo (minuti)	% Fase eluente A	% Fase eluente B	Flusso (µL/min)
0	90	10	200
1	75	25	200
2	75	25	200
5	10	90	200
5,7	10	90	200
5,8	90	10	200
7	90	10	200

Parametri di acquisizione. Tabella degli ioni frammento con relativi parametri di massa

Analita	Q1 (Da)	Q3 (Da)	DP (V)	EP (V)	CE (V)
Glifosato-FMOC	390,1	168,0	20	-10	-20
Glifosato-FMOC	390,1	149,8	20	-10	-35
AMPA-FMOC	332,2	110,0	27	-3	-15
AMPA-FMOC	332,2	136,0	27	-3	-22
Glufosinate-FMOC	402,2	180,0	20	-3	-20
Glufosinate-FMOC	402,2	206,0	20	-3	-20
Glifosato ¹³ C ² ¹⁵ N-FMOC	392,1	170,0	20	-10	-20
Glifosato ¹³ C ² ¹⁵ N-FMOC	392,1	151,9	20	-10	-35
AMPA ¹³ C ¹⁵ N-FMOC	334,2	112,0	27	-3	-15
AMPA ¹³ C ¹⁵ N-FMOC	334,2	138,0	27	-3	-22

Q1: m/z selezionato dal primo quadrupolo; Q3: m/z selezionato del terzo quadrupolo (per ciascun analita il primo viene definito quantificatore Q; il secondo qualificatore q); DP: Declustering Potential; EP: Entrance Potential; CE: Collision Energy

A3. Elenco dei principali parametri statistici ottenuti operando in LC-HRMS nelle condizioni di cui al metodo di prova

Di seguito sono riassunti i risultati tratti dai report dell'ente organizzatore dei *Proficiency Test* (AGLAE).

Valutazione del limite di ripetibilità del metodo eseguite su campione oggetto di *Proficiency Test*

Analita	Confronto interlaboratorio	n. ripetizioni	valore medio (µg/L)	Scarto tipo (µg/L)	Limite di ripetibilità (µg/L)
AMPA	AGLAE 15M55.1	8	0,291	0,023053	0,076
AMPA	AGLAE 15M55.2	8	0,600	0,010385	0,034
Glifosato	AGLAE 15M55.2	8	0,249	0,010471	0,035
Glifosato	AGLAE 15M55.1	8	0,174	0,015344	0,051

Riassunto dei risultati dei confronti interlaboratorio

Analita	Confronto interlaboratorio	Lab. n.	Valore (µg/L) x	Valore di consenso (µg/L) m	Scarto tipo media lab. (µg/L) s _z (R)	Z-score
AMPA	AGLAE 15M55.1	28	0,2920	0,3822	0,0601	-1,50
AMPA	AGLAE 15M55.2	28	0,6433	0,5552	0,1012	+0,87
AMPA	AGLAE 16M55.1	26	0,1430	0,1361	0,0222	+0,31
Glifosate	AGLAE 15M55.1	28	0,1738	0,2263	0,0303	-1,74
Glifosate	AGLAE 15M55.2	28	0,2063	0,3222	0,1169	-0,99
Glifosate	AGLAE 16M55.1	26	0,1620	0,1285	0,0273	+1,23

Valutazione dell'esattezza del metodo realizzata attraverso la partecipazione ai *Proficiency Test* dettagliati in colonna "Confronto interlaboratorio"

Confronto interlaboratorio	Analita	Esattezza (%)
AMPA	AGLAE 15M55.1	76,4
AMPA	AGLAE 15M55.2	115,8
AMPA	AGLAE 16M55.1	105,1
Glifosate	AGLAE 15M55.1	76,8
Glifosate	AGLAE 15M55.2	64,0
Glifosate	AGLAE 16M55.1	126,1

Valutazione dell'incertezza del metodo realizzata attraverso la partecipazione ai *Proficiency Test* dettagliati in colonna "confronto interlaboratorio"

Confronto interlaboratorio	Analita	Scarto tipo mg/L s _z	Valore di riferimento mg/L m	Incertezza estesa Ue=k × s _z	CV%
AMPA	AGLAE 15M55.1	0,0601	0,3822	0,1202	16,0
AMPA	AGLAE 15M55.2	0,1012	0,5552	0,2024	18,5
AMPA	AGLAE 16M55.1	0,0222	0,1361	0,0444	17,0
Glifosate	AGLAE 15M55.1	0,0303	0,2263	0,0606	13,5
Glifosate	AGLAE 15M55.2	0,1169	0,3222	0,2338	36,5
Glifosate	AGLAE 16M55.1	0,0273	0,1285	0,0546	21,5

ISS.CBA.050.REV00

**GLIFOSATO, AMPA E GLUFOSINATO AMMONIO:
METODO IN DERIVATIZZAZIONE PRE-COLONNA
CON ACCQ™-TAG E ANALISI STRUMENTALE
IN UPLC™-MSMS**

0. Generalità e introduzione

Il glifosato (N-(phosphonomethyl) glycine) è il diserbante ad ampio spettro più venduto su scala mondiale. L'ampia diffusione è correlata all' utilizzo di semi geneticamente modificati in grado di resistere all'azione del pesticida stesso. Il suo principale prodotto di degradazione è l'AMPA (AminoMethylPhosphonic Acid).

Le caratteristiche chimico-fisiche di tali composti hanno importanti implicazioni relative alla persistenza e alla diffusione nell'ambiente.

Il glifosato è un composto non volatile e fotoresistente, altamente solubile in acqua, praticamente insolubile nei più comuni solventi organici. Possiede quattro valori di costante di dissociazione e la dissociazione pH-dipendente determina la speciazione della molecola nei sistemi acquatici. È, inoltre, un chelante polidentato che si lega ai "substrati" attraverso gli atomi di ossigeno determinandone l'assorbimento nel suolo/sedimenti dove subisce una degradazione microbica con produzione del suo principale metabolita AMPA (numero CAS e peso molecolare in Tabella 1).

L'AMPA ha un'attività biologica di potenza paragonabile a quella del composto parentale. Pertanto, nonostante la degradazione del glifosato, gli effetti tossici su organismi bersaglio si protraggono nel tempo. Studi di campo riportano una sua maggior persistenza rispetto al parentale, con un tempo di dimezzamento pari a 240-958 giorni in alcuni tipi di suolo. Inoltre, la sostanza risulta fortemente adsorbita al suolo e ha quindi una bassa capacità a percolare.

Tabella 1. Sostanze attive

Sostanza attiva	numero CAS	PM
Glifosato	1071-83-6	169,1
AMPA	1066-51-9	111,0
Glufosinato	51276-47-2	181,13

1. Campo di applicazione

Il presente metodo di prova consente il riconoscimento e la quantificazione della frazione disciolta del glifosato, dell'AMPA e del glufosinato ammonio.

La metodologia è applicabile alle acque: potabili, destinate al consumo umano, superficiali e sotterranee, con un LOQ di 0,01 µg/L e un range di linearità che si estende fino a 5 µg/L, senza l'introduzione nell'analisi di preliminari step di preconcentrazione.

Il metodo sviluppato garantisce il raggiungimento dei valori di parametro previsti dal DL.vo 31/01, e s.m.i., e degli standard di qualità ambientali (SQA) previsti dal DL.vo 152/2016 e s.m.i.

Il metodo di prova consente la determinazione quantitativa con esattezza e precisione compatibili con le caratteristiche di prestazione richieste dalle citate normative, in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025.

2. Principio del metodo

L'analisi del glifosato, dell'AMPA e del glufosinato ammonio, si basa sulla determinazione mediante cromatografia liquida, ad alta prestazione accoppiata ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo e sorgente *elettrospray* (UPLC™-MSMS), previa derivatizzazione pre-colonna con 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC). I costituenti sono separati in gradiente di eluizione e la quantificazione è ottenuta per singolo punto da standard esterni marcati.

3. Interferenze e causa di errori

Le fonti di contaminazione più probabili sono costituite dai solventi, dai reagenti, dalla vetreria e dai materiali plastici utilizzati nelle procedure. Ulteriori apporti di contaminazioni possono derivare dalle cartucce di estrazione in fase solida.

Il materiale plastico (es. cartucce di estrazione in fase solida SPE, i tappi delle bottiglie, i puntali delle micropipette, impianti di distribuzione, ecc.) possono rilasciare plastificanti e altri additivi delle plastiche.

Per questo motivo tutta la vetreria utilizzata per l'analisi e il prelievo deve essere opportunamente pulita ed esente da tracce degli analiti.

I solventi e i reagenti devono essere del grado di purezza adeguata per l'analisi dei residui. Possono rappresentare una causa di interferenze alcune sostanze organiche coestratte con i residui di prodotti fitosanitari, in modo particolare nel caso di acque superficiali.

Anche il Calcio e il Magnesio, ioni solitamente presenti in acque con durezza medio alta, potrebbe influire negativamente nelle determinazioni del glifosato e AMPA. In tal caso la metodica prevede un pretrattamento del campione, come successivamente descritto (7.1).

4. Campionamento e conservazione dei campioni

Il prelievo e la successiva conservazione dei campioni avviene secondo la norma ISO 5667-3:2012. I campioni vengono prelevati in recipienti di polietilene o polipropilene (6.3.7). I tempi di conservazione, indicati in Tabella A1 della ISO 5667-3:2012, sono di 6 giorni se il campione viene refrigerato e di 1 mese se il campione viene congelato a -20°C. Nel caso di un campione congelato, prima di procedere alle operazioni analitiche, le aliquote di prova vengono scongelate mantenendole a temperatura ambiente per circa 24 ore.

5. Apparecchiature

- (5.1) Bilancia analitica, risoluzione 0,00001 g;
- (5.2) UPLC™-MSMS ACQUITY H-Class, I-Class/Xevo TQ-S o equivalente.

6. Reagenti e materiali

6.1. Reagenti

- (6.1.1) Acqua milli-Q con le caratteristiche previste dalla norma UNI EN ISO 3696;
- (6.1.2) Metanolo (grado LC-MS);
- (6.1.3) Acido formico (grado LC-MS);
- (6.1.4) AccQ-Tag™ Ultra derivatization Kit No [186003836] costituito da:
 - (6.1.4.1) Tetraborato di sodio (soluzione al 5%),
 - (6.1.4.2) Acetonitrile,
 - (6.1.4.3) Derivatizzante (6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate);
- (6.1.5) Ammonio formiato (grado LC-MS);
- (6.1.6) Acido Cloridrico concentrato (HCl), 32%;
- (6.1.7) Potassio idrossido p.a. (KOH);
- (6.1.8) Glifosato, purezza > 98% (CAS 1071-83-6);
- (6.1.9) Acido aminometilfosfonico (AMPA), purezza > 98% (CAS 1066-51-9);
- (6.1.10) 1,2-13C215N glifosato, purezza > 98% (CAS 1185107-63-4);
- (6.1.11) 13C15N Acido aminometilfosfonico (AMPA), purezza > 98%;
- (6.1.12) Glufosinato ammonio, purezza > 98% (CAS 77182-82-2);
- (6.1.13) D3-glufosinato ammonio, purezza > 98% (CAS 77732-18-5);
- (6.1.14) 2-13C15N glifosato, purezza > 98% (CAS 285978-24-7).
- *Soluzioni*
 - (6.2.1) Soluzioni standard di glifosato (6.1.8), AMPA (6.1.9) e glufosinato ammonio (6.1.12) alla concentrazione di 1000 mg/L preparate con acqua MilliQ (6.1.1) in provette di polietilene. Queste soluzioni possono essere conservate a 4°C per 1 mese;
 - (6.2.2) Soluzione madre dei marcati di glifosato (6.1.10) o (6.1.14), AMPA (6.1.11) e glufosinato ammonio (6.1.13) alla concentrazione di 100 mg/L preparate in acqua (6.1.1). Queste soluzioni possono essere conservate a 4°C per 1;
 - (6.2.3) Soluzione diluita dei marcati di glifosato, AMPA e glufosinato ammonio alla concentrazione di 0,1 mg/L preparate per diluizione dalla 6.2.2;
 - (6.2.4) Soluzione HCl 6N, prelevare 50 mL di HCl 32% (6.1.6) e diluirlo in 50 mL di acqua 6.1.1;
 - (6.2.5) Soluzione KOH 6N, pesare 33,66 g di KOH (6.1.7) e solubilizzarli in 100 mL di acqua 6.1.1;
 - (6.2.6) Fase Eluente A per UPLC™: Acqua (6.1.1), acido formico (6.1.3) allo 0,1%;
 - (6.2.7) Fase Eluente B per UPLC™: Acetonitrile (6.1.4.2), acido formico (6.1.3) allo 0,1%.

6.2. Materiali

- (6.3.1) Colonna Acquity UPLC™ HSS T3 1,8µm 2,1 x 100 mm o equivalente;
- (6.3.2) Vial 700 µL in PTFE;
- (6.3.3) Micropipetta a spostamento positivo volume variabile massimo 100 µL;

- (6.3.4) Micropipetta a spostamento positivo volume variabile massimo 1000 μL ;
- (6.3.5) Filtri 13 mm 0,2 μm GHP o equivalenti;
- (6.3.6) Vetreria di classe A;
- (6.3.7) Provette in materiale polietilene PE o polipropilene PP da 50 mL e da 10 mL;
- (6.3.8) Siringhe in (PE) o (PP).

7. Procedure di derivatizzazione, separazione e misura

7.1. Determinazione di glifosato, AMPA e glufosinato ammonio mediante derivatizzazione con AccQ-Tag™

Un'aliquota del campione (10 mL) viene preventivamente filtrata su filtri GHP (6.3.5) e addizionata di 10 μL di una soluzione in miscela di materiali di riferimento isotopicamente arricchiti (1,2- $^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$ glifosato e $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ AMPA), a concentrazione 0,1 mg/L (6.2.3).

Tale addizione corrisponde a un valore di concentrazione nell'aliquota di 0,1 $\mu\text{g/L}$.

Successivamente vengono prelevati 440 μL dall'aliquota e addizionati di 50 μL di tampone borato (6.1.4.1) e 10 μL di derivatizzante a 3000 mg/L; 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) (6.1.4.3) La soluzione così trattata viene agitata tramite vortex e portata alla temperatura di 55°C per 10 minuti.

Nel caso di campioni con valori di concentrazione di Ca^{2+} e Mg^{2+} superiori a 3 mmoli/L si addizionano ai 10 mL di campione filtrati la soluzione di HCl 6N (6.2.4) fino a circa pH 1.

Si agita per qualche minuto e si addiziona la miscela di materiale isotopicamente arricchito (6.2.3) come sopra descritto.

Successivamente l'aliquota viene neutralizzata con la soluzione di KOH 6N (6.2.5) fino ad un valore di pH compreso tra 6 e 7, si procede alla derivatizzazione come sopra descritto.

7.2. Determinazione di glifosato, AMPA e glufosinato ammonio mediante UPLC™-MSMS

7.2.1. Condizioni cromatografiche

L'analisi strumentale viene eseguita secondo i parametri cromatografici riportati in Tabelle 2 e 3.

Tabella 2. Condizioni cromatografiche

Parametro operativo	Settaggio
Colonna	Acquity UPLC™ HSS T3 1,8 μm 2,1 x 100 mm
Temperatura colonna	40°C
Fase eluente A	Acqua, acido formico 0,1% (7.2.6)
Fase eluente B	Acetonitrile, acido formico 0,1% (7.2.7)
Volume di iniezione	30 μL

Tabella 3. Gradiente cromatografico

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Flusso (mL/min)
0,00	100	0	0,4
3,00	94	6	0,4
3,10	5	95	0,4
4,00	100	0	0,4

7.2.2. Condizioni spettrometriche

Il metodo di massa prevede una ionizzazione positiva mediante interfaccia ESI e analisi in modalità MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). I rapporti massa/carica (m/z) ricercati, caratteristici delle specie ioniche in oggetto sono riportati in Tabella 4, i parametri di acquisizione in Tabella 5.

Tabella 4. Transizioni ioniche, energia di collisione (CE), voltaggio del cono (CNV)

Analita	Transizione quantificatrice (m/z)	CNV	CE	Transizione qualificatrice (m/z)	CNV	CE
Glifosato-AQC	340,1 > 171,10	22	24	340,1 > 116,25	22	54
1,2- ¹³ C ₂ ¹⁵ N Glifosato-AQC	342,1 > 171,10	22	24	342,1 > 116,25	22	54
2- ¹³ C ¹⁵ N glifosato-AQC	342,1 > 171,10	22	24	342,1 > 116,25	22	54
AMPA-AQC	282,0 > 171,10	24	14	282,0 > 116,25	24	46
¹³ C ¹⁵ N AMPA-AQC	284,0 > 171,10	24	14	284,0 > 116,25	24	46
Glufosinato ammonio-AQC	352,1 > 171,10	22	20	352,1 > 116,25	22	53
D3-glufosinato ammonio-AQC	353,1 > 171,10	22	20	355,1 > 116,25	22	53

Tabella 5 parametri di acquisizione

Parametro operativo	Valore/Settaggio
Source fitted	
Ionization	ESI+
Capillary Voltages (kV)	1
Desolvation Temperature (°C)	650
Gas flow	
Desolvation (L/Hr)	950
Cone (L/Hr)	150
Nebulizer (bar)	7,0

8. Calcolo ed espressione dei risultati

8.1. Analisi qualitativa

L'identificazione degli analiti viene condotta per confronto con l'iniezione di una miscela di standard di riferimento, utilizzando diversi criteri.

Il Tempo di ritenzione (Tr) costituisce il criterio più semplice di riconoscimento dell'analita nel campione. Infatti il Tr, a parità di condizioni cromatografiche, deve corrispondere a quello dello standard di taratura, all'interno di una finestra che tiene conto anche del potere di risoluzione del sistema cromatografico.

Tuttavia poiché il Tr può avere delle piccole variazioni nelle diverse corse cromatografiche, la metodologia prevede l'utilizzo del tempo di ritenzione relativo, cioè il rapporto tra il tempo di ritenzione dell'analita e quello del rispettivo standard marcato 1,2-¹³C₂¹⁵N glifosato o 2-¹³C¹⁵N glifosato, ¹³C¹⁵N AMPA e D3-glufosinato ammonio rispettivamente per glifosato, AMPA e glufosinato ammonio. Il tempo di ritenzione corrisponde a quello medio degli standard con una tolleranza del $\pm 0,1$ min.

Con un analizzatore di massa si ha la conferma dell'identificazione dell'analita tramite i seguenti criteri:

- presenza di ioni specifici (si consiglia di considerarne almeno 3);

- verifica del rapporto tra le intensità degli ioni specifici dell'analita riscontrati nel campione e quelli dell'analita nella miscela standard di riferimento (o in un campione spiked ad una concentrazione comparabile), e misurati nelle stesse condizioni. Le tolleranze per i due rapporti devono essere in accordo con quelle della Tabella 6.

Tabella 6. Tolleranze massime consentite per intensità di ioni relative utilizzando una gamma di tecniche di spettrometria di massa

Rapporto ionico Meno intenso/più intenso	CI-GC-MS, GC-MSn, LC-MS, LC-MSn (relativa)
0,5-1,0	± 30%
0,2-0,5	± 30%
0,1-0,2	± 30%
≤ 0,10	± 30%

8.2. Analisi quantitativa

L'analisi quantitativa si basa sul confronto dell'area del picco di un composto presente in un campione con quella di uno o più standard. Ogni analita viene dosato quantitativamente in base al valore dell'area o dell'area relativa (rapporto tra quella del picco d'interesse e quella dello standard interno).

Per ogni analita da quantificare, da solo o in miscela, vengono preparate soluzioni di taratura a concentrazione nota, ottenendo così una relazione che correla le aree con la quantità introdotta.

La quantificazione è ottenuta dal calcolo del rapporto tra la risposta del glifosato, dell'AMPA e del glufosinato ammonio nel campione rispetto ai correlativi standard marcati, aggiunti prima della derivatizzazione, in funzione dei fattori di risposta eseguiti in isoconcentrazione per la coppia 1,2-¹³C₂¹⁵N glifosato/glifosato o 2-¹³C¹⁵N glifosato/glifosato, ¹³C¹⁵N AMPA/AMPA e D3 glufosinato ammonio/glufosinato ammonio.

I campioni in cui la concentrazione eccede il limite superiore della curva devono essere nuovamente analizzati dopo averli riportati entro l'intervallo tramite diluizione del campione.

8.3. Calcolo e espressione dei risultati

La quantificazione degli analiti viene effettuata secondo la seguente relazione:

$$C_{(x)} = K_{ST} * C_{IS} * \left(\frac{A_S}{A_{an}} \right)$$

dove: $C_{(x)}$ = Quantità assoluta dell'analita nel campione
 K_{ST} = Fattore di risposta determinati in isoconcentrazione per le coppie glifosato/glifosato-1,2-¹³C₂¹⁵N o glifosato/glifosato-2-¹³C¹⁵N, Acido aminometilfosfonico (AMPA)/¹³C¹⁵ND2 Acido aminometilfosfonico (AMPA) e glufosinato ammonio/D3 glufosinato ammonio.
 C_{IS} = Quantità assoluta dello IS marcato
 A_S = Area del segnale analitico dello standard interno marcato nel campione
 A_{an} = Area del segnale nel campione

I risultati e l'incertezza di misura sono espressi in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025. Sono ritenuti accettabili ai fini del controllo del processo, valori di KST pari a 1± 15%.

9. Prestazioni del metodo

Il laboratorio dovrà verificare l'applicazione del metodo di prova prima di eseguire le analisi sui campioni (validazione).

Nella Parte C "Caratteristiche di prestazione dei metodi ISS", si riportano in tabella dedicata si riportano i risultati dell'applicazione del presente metodo di prova in un laboratorio.

Bibliografia

ISO 5667-3:2012. *Qualità dell'acqua-Campionamento - Parte 3: conservazione e manipolazione dei campioni di acqua*. Geneva: International Organization for Standardization; 2012.

International Agency for Research on Cancer. *Glyphosate*. Lyon: IARC; 2015. (Monographs Volume 112 (2015)).

Istituto Superiore per la Protezione Ambientale (ISPRA). *Rapporto nazionale pesticidi nelle acque*. Dati 2013-2014. Roma: Istituto Superiore per la Protezione Ambientale, 2016. (Rapporti ISPRA 244/2016).

Salazar C, Armenta JM, Shulaev V. An UPLCTM-ESI-MSMS assay using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate derivatization for targeted amino acid analysis: application to screening of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Metabolite*, 2012;2(3):398-428.

Allegati al metodo ISS.CBA.050.rev00

A1. Risultati dell'applicazione del metodo di prova in un proficiency test

Parametri statistici determinati attraverso 10 ripetizioni su materiale proveniente da *Proficiency Test* a diverse concentrazioni

Parametro	Proficiency Test AQUACHECK	Valore assegnato µg/L	Deviazione Standard robusta µg/L	Mediana µg/L	Deviazione Standard robusta %	Incertezza estesa K=2 %	Deviazione Standard Laboratorio %
Glifosato	556	0,0317	0,00215	0,0325	6,6	13,2	6,2
AMPA	556	0,0218	0,00044	0,023	1,9	3,8	6,19
Glifosato	552	0,0736	0,00875	0,0775	11,3	22,6	9,92
AMPA	552	0,0623	0,00363	0,0621	5,8	11,6	5,69

Riassunto dei risultati del confronto interlaboratorio

Parametro	ProficiencyTest AQUACHECK	Valore assegnato µg/L	Esattezza %
Glifosato	556	0,0317	101,6
AMPA	556	0,0218	104,1

ISS.CBA.051.REV00**COMPOSTI PERFLUOROALCHILICI:
METODO LC-HRMS (INIEZIONE DIRETTA)****0. Generalità e introduzione**

I PFAS sono composti che, a partire dagli anni cinquanta, si sono diffusi in tutto il mondo, utilizzati per rendere resistenti ai grassi e all'acqua i tessuti, la carta, i rivestimenti per contenitori di alimenti ma anche per la produzione di pellicole fotografiche, schiume antincendio, detergenti per la casa.

Come conseguenza dell'estensiva produzione e uso dei PFAS e delle loro caratteristiche chimiche, questi composti sono stati rilevati in concentrazioni rilevanti nell'ambiente e negli organismi viventi. Se smaltiti illegalmente o non correttamente nell'ambiente, i PFAS penetrano facilmente nelle falde acquifere e, attraverso l'acqua, raggiungono i campi e i prodotti agricoli interessando quindi la catena alimentare.

Ad alte concentrazioni sono tossici non solo per l'uomo, ma per tutti gli organismi viventi: queste sostanze tendono infatti ad accumularsi nell'organismo attraverso processi di bio - amplificazione (che avvengono quando gli organismi ai vertici della piramide alimentare ingeriscono quantità di inquinanti superiori a quelle diffuse nell'ambiente).

1. Campo di applicazione

Il presente metodo di prova consente la determinazione dei composti perfluoroalchilici (PFAS) riportati in Tabella 1, in campioni di acqua destinata e da destinare al consumo umano, **minerale**, sotterranea e superficiale.

Tabella1. Lista di composti perfluoroalchilici analizzati con i relativi limiti di quantificazione.

Sigla	CAS	Descrizione	LOQ (µg/L)	
			Iniezione diretta	SPE on-line
PFOS	1763-23-1	Perfluoro Ottan Sulfonato	0,003	0,0002
PFBS	375-73-5	Perfluoro Butan Sulfonato	0,005	0,001
PFOA	335-67-1	Acido Perfluoro Ottanoico	0,005	0,005
PFBA	375-22-4	Acido Perfluoro Butanoico	0,005	0,005
PFPeA	2706-90-3	Acido Perfluoro Pentanoico	0,005	0,005
PFHxA	307-24-4	Acido Perfluoro Esanoico	0,005	0,005
PFHxS	355-46-4	Perfluoro Esan Sulfonato	0,005	0,005
PFHpA	375-85-9	Acido Perfluoro Eptanoico	0,005	0,005
PFNA	375-95-1	Acido Perfluoro Nonanoico	0,005	0,005
PFDeA	335-76-2	Acido Perfluoro Decanoico	0,005	0,005
PFUnA	2058-94-8	Acido Perfluoro Undecanoico	0,005	0,005
PFDoA	307-55-1	Acido Perfluoro Dodecanoico	0,005	0,005

Il metodo di prova proposto è concettualmente applicabile ad altri composti rientranti genericamente nei PFAS ad esempio: 6:2 FTSA fluorotelomero, HFPO-DA (acido 2-eptafluoropropossi-tetrafluoropropionico), ecc.

I limiti di quantificazione (LOQ), ottenuti sperimentalmente per ciascun analita, sono riportati nelle ultime due colonne della Tabella 1 con riferimento alla tecnica di introduzione del campione utilizzata riportati nella Tabella seguente.

Per tutti gli analiti il metodo è applicabile per valori di concentrazione a partire da 0,005 µg/L tranne che per PFOS 0,003 µg/L (limite di quantificazione) come riportato in Tabella 1.

2. Principio del metodo

Il metodo utilizza le potenzialità analitiche della tecnica cromatografica liquida ad alta o altissima prestazione interfacciata con spettrometri di massa ad alta risoluzione (HPLC-HRMS o UHPLC-HRMS) per determinare i composti perfluoroalchilici (PFAS) per iniezione diretta, con o senza preconcentrazione tramite estrazione in fase solida in linea (SPE on-line).

I limiti di quantificazione strumentale raggiungibili sono dell'ordine dei ng/L o di loro frazioni.

Tali limiti risultano idonei allo scopo di verifica della conformità relativa ai limiti normativi delle aliquote di prova di acque potabili, e/o destinate alla potabilizzazione, minerali, superficiali e sotterranee.

L'applicazione della preconcentrazione tramite estrazione in fase solida in linea (SPE on-line) permette il raggiungimento di limiti di quantificazione strumentale necessari alla verifica del rispetto degli standard di qualità ambientali per gli analiti in oggetto su aliquote di acqua destinata e da destinare al consumo umano, minerale, sotterranea e superficiale.

3. Interferenze e causa di errore

I contenitori per il campionamento dovrebbero essere di materiale inerte rispetto al campione; pertanto è meglio evitare tutte le plastiche fluoro polimeriche, inclusi fluoro elastomeri e PTFE sia per il campionamento che per lo stoccaggio. La vetreria inoltre dovrebbe essere evitata a causa di un possibile assorbimento degli analiti sulla superficie vetrosa.

È consigliabile testare i materiali prima del loro utilizzo riguardo a possibili contaminazioni del fondo analitico.

La strumentazione LC è suscettibile di contaminazione. È consigliabile controllare la contaminazione dei bianchi di processo derivante da tutte le componenti dello strumento come tubi, filtri degli eluenti, valvole, e circuiti di degassaggio. Tutte le parti idrauliche a contatto con l'eluente o i campioni dovrebbero essere in PEEK o in acciaio inox.

4. Procedure di campionamento

Il prelievo dei campioni avviene secondo la norma ISO 5667- 3:2018 e ISO 5667-14:2014, nonché del metodo ISS.PGA.901.REV01. I campioni vengono prelevati in aliquote del volume minimo di 50 mL in una provetta di polipropilene (6.3.1) (PP o HDPE) o in bottiglia di materiale plastico dotata di liner e tappo a vite.

I tempi di conservazione sono di 2 settimane se il campione viene refrigerato alla temperatura di 4±3°C. Tempi di conservazione più lunghi possono essere ottenuti tramite congelamento dell'aliquota e mantenimento della stessa a temperatura pari o inferiore a -18°C.

Data la stabilità chimica all'ossidazione degli analiti, non è necessario nessun trattamento specifico per le acque sottoposte a trattamento di potabilizzazione.

5. Apparecchiature

Per l'esecuzione del metodo sono necessarie le seguenti apparecchiature:

- (5.1) Cromatografo liquido per iniezione diretta ed eventuale sistema per la preconcentrazione on-line;
- (5.2) Analizzatori di massa ad alta risoluzione con sorgente ESI. In spettrometria di massa la risoluzione è la capacità di distinguere tra due picchi a massa vicina. Se chiamiamo M il valore di m/z di un picco e ΔM la minima distanza tra due picchi a cui l'altezza della valle tra i picchi h è meno del 10% dell'altezza dei picchi H , la risoluzione è data da $M/\Delta M$. Per una misura accurata della massa la risoluzione deve essere dell'ordine di 15.000 e oltre. Per gli scopi del metodo la strumentazione dovrebbe garantire accuratezze ≤ 5 ppm sia sul precursore (Full scan MS) che sui prodotti di frammentazione (product scan MSMS).
- (5.3) Centrifuga (almeno 5000 giri/min).

6. Reagenti e materiali

6.1. Reagenti

- (6.1.1) Acqua ultrapura (vedi caratteristiche norma UNI EN ISO 3696:1995);
- (6.1.2) Acido Formico 98-100% MS additive grade;
- (6.1.3) Formiato d'ammonio MS additive grade;
- (6.1.4) Isopropanolo puro per LC-MS;
- (6.1.5) Metanolo puro per LC-MS.

6.2. Materiali di riferimento

- (6.2.1) Standard mix PFAS (Tabella 1) (es. Wellington Lab PFAC-MCX native 2000 ng/mL in metanolo);
- (6.2.2) Standard mix PFAS isotopicamente arricchiti al ^{13}C , esempio: Wellington Lab MPFAC-C-IS ILS 2000 ng/mL in metanolo;
- (6.2.3) Standard mix PFAS di origine differente da quelli precedenti, utilizzati come check di controllo per verificare l'esattezza.

6.3. Materiali

- (6.3.1) Provette in materiale polietilene PE o polipropilene PP da 50 mL e da 10 mL;
- (6.3.2) *Vial* in polipropilene PP da 2 mL e/o *vial* in vetro da 10 mL;
- (6.3.3) Colonna di separazione porose (es. Thermo Hypersil Gold™ aQ 100 mm x 2,1 μ m) o core-shell (es. Phenomenex Kinetex™ PFP 150 x 2,1 mm; 2,6 μ m) o equivalenti;

- (6.3.4) Colonna di arricchimento a supporto siliceo (es. Thermo Hypersil Gold™ aQ 20 mm x 2,1 µm o equivalenti) o polimerico (Waters Oasis™ HLB, 3 x 0,2 mm; 1,5 µm) o equivalenti;
- (6.3.5) Filtri a disco dotati di attacco *luer-lock* in cellulosa rigenerata e corpo in materiale plastico di porosità pari a 0,2 µm esenti da PFAS.

7. Procedimento

7.1. Preparazione del campione

L'analisi avviene per iniezione del campione, precedentemente addizionato di una quantità prefissata di uno standard interno isotopicamente arricchito (standard interno marcato), direttamente nella colonna del cromatografo o previa preconcentrazione in una colonna SPE on-line.

Si consiglia, prima dell'aggiunta dello standard interno marcato, di ridurre la quantità di particolato eventualmente presente.

Tale risultato può essere raggiunto tramite centrifugazione (es. sottoponendo ad un ciclo di 5 minuti a 6500 giri al minuto e quindi prelevando il surnatante) (5.2) o tramite filtrazione (6.3.5). Nel caso di utilizzo della SPE on-line si suggerisce di acidificare l'aliquota di prova con acido formico in quantità di 100 µL per 10 mL di campione.

La quantità da iniettare dipende dal loop e dalla tipologia di introduzione del campione adottata (iniezione diretta o SPE on-line).

Le prestazioni dichiarate in Tabella 1, prima colonna LOQ, sono state ottenute iniettando 100 µL di campione a cui è stata aggiunta una quantità di standard interno corrispondente a circa metà dell'intervallo di taratura.

Nel caso di analisi con preconcentrazione on-line si può utilizzare un sistema tipo EQuan MAX™ o altro di prestazioni equivalenti per preconcentrare su una colonna dedicata (6.3.3 e 6.3.4) un volume di campione idoneo al raggiungimento delle prestazioni desiderate (1-5 mL). Ad esempio, utilizzando un loop adeguato si può abbassare il limite di quantificazione raggiungendo le prestazioni dichiarate nella seconda colonna LOQ di Tabella 1 o migliorative.

Per quanto riguarda la preconcentrazione offline si rimanda invece al punto 8.1 della norma ISO 25101:2009.

Nel caso di campioni con presenza di particolato è consigliabile la centrifugazione e il prelievo del surnatante rispetto alla filtrazione per non introdurre fonti di errore/contaminazione.

7.2. Misura strumentale mediante cromatografo liquido accoppiato ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione

L'analisi strumentale viene effettuata mediante cromatografia liquida abbinata ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione.

In Allegato A1 si riportano, a titolo di esempio, condizioni cromatografiche e strumentali a cui fare riferimento.

8. Calcolo ed espressione del risultato

8.1. Analisi qualitativa

Con uno spettrometro di massa ad alta risoluzione si ha la conferma qualitativa dell'identificazione dell'analita tramite i seguenti criteri indicati nel documento SANTE/11813/2017 ovvero:

- tempo di ritenzione (T_r): Tempo di ritenzione che corrisponda al T_r medio degli standards esterni $\pm 0,1$ min o al T_r del l'eventuale composto marcato;
- presenza di almeno due ioni con rapporti massa carica (m/z) caratteristici, rispettivamente (preferibilmente) lo ione molecolare deprotonato e un suo frammento, entrambi con accuratezza di massa ≤ 5 ppm. Si riportano in Tabella 2 i valori dei precursori ($[M-H]^-$) e dei frammenti caratteristici. Il rapporto ionico tra le masse non è una conferma fondamentale per analizzatori in alta risoluzione mentre è richiesto per analizzatori con risoluzione unitaria (rif. SANTE/11813/2017, tabella 4).

Tabella 2. Composti perfluoroalchilici. Massa esatta, precursori ed esempi di frammenti caratteristici

Sostanza attiva	Formula	massa esatta (monoisotopica)	$[M-H]^-$	Frammento caratteristico
PFBA, perfluorobutyric acid	$C_4HO_2F_7$	213,9865	212,9792	168,9894
PFPeA, perfluoropentanoic acid	$C_5HO_2F_9$	263,9833	262,9760	218,9862
PFBS, perfluorobutane sulfonate	$C_4HO_3SF_9$	299,9503	298,9430	79,9574
PFHxA, perfluorohexanoic acid	$C_6HO_2F_{11}$	313,9801	312,9728	268,9830
PFHpA, perfluoroheptanoic acid	$C_7HO_2F_{13}$	363,9769	362,9696	318,9798
PFHxS, perfluorohexane sulfonate	$C_6HO_3SF_{13}$	399,9438	398,9366	79,9574
PFOA, perfluorooctanoic acid	$C_8HO_2F_{15}$	413,9737	412,9664	368,9766
PFNA, perfluorononanoic acid	$C_9HO_2F_{17}$	463,9705	462,9632	418,9734
PFDeA, perfluorodecanoic acid	$C_{10}HO_2F_{19}$	513,9673	512,9600	468,9702
PFOS, perfluorooctane sulfonate	$C_8HO_3SF_{17}$	499,9375	498,9302	79,9574
PFUnA, perfluoroundecanoic acid	$C_{11}HO_2F_{21}$	563,9641	562,9568	518,9670
PFDoA, perfluorododecanoic acid	$C_9HO_2F_{17}$	613,9609	612,9536	568,9638

8.2. Analisi quantitativa

L'analisi quantitativa si basa sul confronto dei rapporti di aree tra i picchi di un composto presente in un campione e il corrispondente composto marcato addizionato prima dell'analisi con quelle di uno o più standard acquisiti nella stessa modalità.

Ogni analita viene quindi dosato quantitativamente in base al valore dell'area relativa (rapporto tra quella del picco d'interesse e quella dello standard interno marcato).

Per ogni analita da quantificare, da solo o in miscela, possono essere preparate soluzioni di taratura a concentrazione nota, ottenendo così una relazione che correla le aree con la quantità introdotta.

La taratura è ottenuta costruendo una curva multilivello con interpolazione lineare. A scopo di una prima valutazione dell'accettabilità di tale curva può essere valutato il valore del coefficiente di correlazione (r^2) che dovrebbe essere quanto più possibile vicino ad un valore unitario.

9. Prestazioni del metodo

Il laboratorio dovrà verificare l'applicazione del metodo di prova prima di eseguire le analisi sui campioni (validazione).

Negli Allegati A2 e A3 si riportano rispettivamente i risultati dell'applicazione del presente metodo di prova in un laboratorio e in un *Proficiency Test*.

Bibliografia

- DeWitt JC (Ed.). *Toxicological effects of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substance*. Cham: Human Press; 2011
- ISO 11352:2012. *Water quality - Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data*. Geneva: International Organization for Standardization; 2012.
- ISO 25101:2009. *Water quality - determination of perfluorooctane-sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) – method for unfiltered samples using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry*. Geneva: International Organization for Standardization; 2009.
- ISO 3696:1995. *Water for analytical laboratory use. Specification and test methods*. Geneva: International Organization for Standardization; 1995.
- ISO 5667-14:2014. *Water quality -- Sampling -- Part 14: Guidance on quality assurance and quality control of environmental water sampling and handling*. Geneva: International Organization for Standardization; 2014.
- ISO 5667-3:2018. *Water quality - Sampling - Part 3: Preservation and handling of water samples*. Geneva: International Organization for Standardization; 2018.
- ISO 8466-2:2001. *Water quality -- Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics -- Part 2: Calibration strategy for non-linear second-order calibration functions*. Geneva: International Organization for Standardization; 2001.
- ISO/TS 13530:2009. *Water quality - Guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis*. Geneva: International Organization for Standardization; 2009.
- Italia. DL.vo 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
- Italia. DL.vo 31/2001: Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano e DM 14/06/2017: Recepimento della direttiva (UE) 2015/1787 che modifica gli allegati II e III della direttiva 98/83/CE sulla qualità delle acque destinate al consumo umano. Modifica degli allegati II e III del decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31
- Ministero della Salute. Decreto 6 luglio 2016: Recepimento della direttiva 2014/80/UE della Commissione del 20 giugno 2014 che modifica l'allegato II della direttiva 2006/118/CE del Parlamento europeo e del Consiglio sulla protezione delle acque sotterranee dall'inquinamento e dal deterioramento.

Allegati al metodo ISS.CBA.051.rev01

A1. Esempio di condizioni cromatografiche

Condizioni cromatografiche

Quale esempio, si riportano le seguenti condizioni:

- Eluente A:
 - Caso 1, iniezione diretta: Acqua con Acido Formico (0,1%) e Formiato d'ammonio (10 mmol)
 - Caso 2, SPE on-line: Acqua, formiato di ammonio 5 mM, acido formico 0,01%, metanolo, 2%).
- Eluente B:
 - Caso 1, iniezione diretta: Acqua con Acido Formico (0,1%) e Formiato d'ammonio (10 mmol)
 - Caso 2, SPE on-line: Metanolo 83%, Isopropanolo 15%, Acqua 2% formiato di ammonio 5 mM, acido formico 0,01%
- Flusso eluente:
 - Caso 1, iniezione diretta: 0,3 mL/min,
 - Caso 2 SPE on-line: 0,4 mL/min.
- Gradiente:
 - Caso 1, iniezione diretta: B 0% per un minuto, 55% a 1,5 min, 80% a 7,5 min, 98% a 10 min e fino a 14,3 min, 0% a 14,5 min e fino a 20 min
 - Caso 2, SPE on-line: B 10% per un minuto, 95% a 20 min, 95% a 25 min, 10% a 27 min, 10% a 32 min.

Condizioni strumentali

Si riportano, quale esempio, le seguenti condizioni adottabili per una apparecchiatura tipo quelle di cui al punto 5 per media o alta risoluzione nelle condizioni cromatografiche riportate:

- Ionizzazione negativa con analisi quantitativa FS (*Full Scan*) degli analiti nativi e marcati. Si utilizzano come qualificatori gli ioni derivanti dalla frammentazione in cella di collisione, o eventualmente in sorgente per i composti carbossilici (perdita gruppo carbossilico)
- Risoluzione: rif. punto 5
- Sheath gas: 32 a.u.
- Aux gas: 10 a.u.
- Voltaggio: 3,5 kV
- Capillary Temp.: 280°C o 250 °C
- Aux heater Temp.: utilizzo 40°C per minimizzare la decarbossilazione. Non si escludono temperatura più elevate in funzione della specificità strumentale.

A2. Risultati dell'applicazione del metodo di prova in un laboratorio

Valutazione della precisione a due livelli di concentrazione.

Parametro	Range ng/L	Valore mis. ng/L	N. Prove	CV%	Incertezza%	Range ng/L	Valore mis. ng/L	N. Prove	CV%	Incertezza%
PFBA	10-100	50	8	3,5	8,5	>100	150	11	3,2	6,9
PFPeA	10-100	50	9	3,7	10,4	>100	150	11	5,3	11,1
PFBS	10-100	50	8	6	23,8	>100	150	7	6,8	15,3
PFHxA	10-100	50	8	3,6	8,9	>100	150	11	4,1	8,7
PFHpA	10-100	50	9	5,1	23,6	>100	150	11	4,4	12,5
PFHxS	10-100	50	8	3,4	7,5	>100	150	11	3,6	7,5
PFOA	10-100	50	9	3,6	15,5	>100	150	11	3,7	9,5
PFNA	10-100	50	9	3,9	13,3	>100	150	11	3,8	9,1
PFOS	10-100	50	9	5	13	>100	150	11	5,1	11
PFDeA	10-100	50	8	5,1	12,9	>100	150	11	3,7	8,6
PFUnA	10-100	50	9	4,1	13,1	>100	150	11	5,3	11,8
PFDoA	10-100	50	9	5,6	23,1	>100	150	11	6,3	16,8

Note: CV: Coefficiente di Variazione

Prove di recupero su campioni reali con aggiunta nota di 100 ng/L degli analiti

Parametro	Concentrazione ng/L (spike)	Numero di prove	Recupero%	CV%
PFBA	100	5	109	3,8
PFPeA	100	5	107	4,6
PFBS	100	5	103	4,3
PFHxA	100	5	103	3,2
PFHpA	100	5	109	4,6
PFHxS	100	5	98	2,5
PFOA	100	5	112	3,5
PFNA	100	5	105	4,8
PFOS	100	5	88	4,6
PFDeA	100	5	86	5,0
PFUnA	100	5	74	5,8
PFDoA	100	5	72	6,6

Note: CV: Coefficiente di Variazione

A3. Risultati dell'applicazione del metodo di prova in un proficiency test

Risultati ottenuti da un laboratorio applicando il presente metodo di prova, con introduzione del campione tramite SPE on-line, nell'esecuzione del proficiency test AGLAE Association, *Proficiency Test PT 18M59.1* riguardante i seguenti composti perfluoroalchili in acqua, maggio 2018-giugno 2018.

Composizione del Proficiency Test

Parametro	Valore target (da aggiunta)	Valore medio	Deviazione standard	Unità di misura
PFOS	124,03	75,674	29,819	ng/L
PFOA	142,44	124,620	26,093	ng/L
PFHS	133,25	119,425	29,909	ng/L
PFHpA	153,24	112,175	39,942	ng/L
PFHxA	119,57	95,520	24,344	ng/L

Risultati ottenuti

Parametro	Valori ottenuti (ng/L)	z-score
PFOS	57,370	-0,61
PFOA	113,360	-0,43
PFHS	119,100	-0,01
PFHpA	100,035	-0,30
PFHxA	93,550	-0,08

ISS.CBA.052.REV00

COMPOSTI PERFLUOROALCHILICI: METODO LC-MSMS (INIEZIONE DIRETTA)

0. Generalità e introduzione

Le sostanze alchiliche poli- o per-fluorurate (PFAS) sono composti costituiti da una catena alchilica idrofobica parzialmente o interamente fluorurata di varia lunghezza e un gruppo funzionale, in genere idrofilico. Queste sostanze sono utilizzate da tempo in una vasta gamma di prodotti industriali e di consumo e a causa della loro persistenza e dell'elevata stabilità chimica sono ormai diffuse in tutte le aree del pianeta.

I PFAS comprendono migliaia di sostanze chimiche, ma gli studi ambientali si sono concentrati principalmente sugli acidi perfluoroalchilsolfonici (PFSA), come ad esempio l'acido perfluorooctansolfonico (PFOS) e gli acidi perfluoroalchilcarbossilici (PFCA), che comprendono l'acido perfluorooctanoico (PFOA). I PFSA e PFCA sono tensioattivi a basso peso molecolare, costituiti da serie omologhe di molecole che differiscono nella lunghezza della catena alchilica (in genere da C4 a C14), in cui tutti gli atomi di carbonio della catena sono legati ad atomi di fluoro. È stato dimostrato che PFOS e PFOA sono persistenti nell'ambiente e bioaccumulabili nella catena trofica. L'introduzione di restrizioni normative per l'uso di PFOS e PFOA ha indotto i maggiori produttori di PFAS a trovare dei sostituti per questi composti soprattutto fra gli omologhi con una più corta catena alchilica o con altre sostanze perfluorurate contenenti legami eteri. Da qui la necessità di metodi multiresiduali, che possano essere impiegati nel monitoraggio di routine, per la determinazione di una serie di acidi perfluoroalchilcarbossilici e perfluoroalchilsolfonici nelle acque, nonché dei loro precursori o sostanze alternative.

1. Campo di applicazione

Il metodo si applica a campioni di acqua destinata e da destinare al consumo umano, minerale, sotterranea e superficiale, per i composti elencati in Tabella 1 e ad ogni altra sostanza compresa nella classe dei PFAS, cioè qualunque sostanza che contenga un gruppo perfluoroalchilico con tre o più atomi di carbonio (cioè $-C_nF_{2n}-$, $n \geq 3$) o un gruppo perfluoroalchiletereo con due o più atomi di carbonio (cioè $-C_nF_{2n}OC_mF_{2m}-$, n e $m \geq 1$) secondo la definizione riportata in OECD, 2018.

Nel caso di iniezione diretta il campo di applicazione è:

- per HFPO-DA, PFHpS,: 0,025-2 µg/L;
- per cC6O4: 0,04-2 µg/L;
- per tutti gli altri composti: 0,005-2 µg/L

Contestualmente è possibile determinare le concentrazioni dei metil-isomeri di PFOA e PFOS (rispettivamente br-PFOA e br-PFOS) sensibili alle transizioni riportate in Tabella 2.

Qualora l'analisi di campioni di acque superficiali debba essere effettuata ai sensi del DL.vo 152/2006, parte terza e ss.mm.ii. è necessario ricorrere ad una preconcentrazione del campione per abbassare il limite di quantificazione del parametro PFOS fino a 0,0002 µg/L. Ove possibile tale preconcentrazione verrà condotta mediante sistemi di arricchimento in linea (SPE on-line). Il

metodo per arricchimento in linea può essere utilizzato anche per tutte le altre sostanze riportate in Tabella 1.

Tabella 1. Composti perfluorurati oggetto di analisi con il metodo qui descritto

Composto	Sigla	Formula	N° CAS
Acido perfluorobutanoico	PFBA	C ₄ HF ₇ O ₂	375-22-4
Acido perfluoropentanoico	PFPeA	C ₅ HF ₉ O ₂	2706-90-3
Acido perfluoroesanoico	PFHxA	C ₆ HF ₁₁ O ₂	307-24-4
Acido perfluoroeptanoico	PFHpA	C ₇ HF ₁₃ O ₂	375-85-9
Acido perfluorooctanoico	PFOA	C ₈ HF ₁₅ O ₂	335-67-1
Acido perfluorononanoico	PFNA	C ₉ HF ₁₇ O ₂	375-91-1
Acido perfluorodecanoico	PFDA	C ₁₀ HF ₁₉ O ₂	335-76-2
Acido perfluoroundecanoico	PFUnDA	C ₁₁ HF ₂₁ O ₂	2058-94-8
Acido perfluorododecanoico	PFDoDA	C ₁₂ HF ₂₃ O ₂	307-55-1
Acido perfluorobutansolfonico	PFBS	C ₄ HF ₉ O ₃ S	375-73-5
Acido perfluoroesansolfonico	PFHxS	C ₆ HF ₁₃ O ₃ S	355-46-4
Acido perfluoroeptansolfonico	PFHpS	C ₇ HF ₁₅ O ₃ S	375-92-8
Acido perfluorooctansolfonico	PFOS	C ₈ HF ₁₇ O ₃ S	1763-23-1
Acido 4:2 Fluorotelomero solfonico	4:2 FTS	C ₆ H ₅ F ₉ O ₃ S	757124-72-4
Acido 6:2 Fluorotelomero solfonico	6:2 FTS	C ₈ H ₅ F ₁₃ O ₃ S	27619-97-2
Acido 8:2 Fluorotelomero solfonico	8:2 FTS	C ₁₀ H ₅ F ₁₇ O ₃ S	39108-34-4
Hexafluoropropylene oxide dimer (GenX)	HFPO-DA	C ₆ HF ₁₁ O ₃	62037-80-3
Difluoro{[2,2,4,5-tetrafluoro-5-(trifluoromethoxy)-1,3-dioxolan-4-yl]oxy}acetic acid	cC6O4	C ₆ HF ₉ O ₆	1190931-41-9

2. Principio del metodo

Il metodo si basa sull'analisi del campione acquoso in LC con analizzatore di massa a triplo quadrupolo, previa aggiunta di opportuni standard interni marcati. La ionizzazione del campione avviene per *electrospray* negativa ESI (-) e l'acquisizione in modalità *Multiple Reaction Monitoring* (MRM).

Il campione può essere iniettato direttamente oppure dopo preconcentrazione (es. arricchimento in linea (SPE on-line) a seconda del limite di quantificazione desiderato).

3. Interferenze e causa di errore

Poiché polimeri perfluorurati, utilizzati nella manifattura di materiali da laboratorio e di componenti della strumentazione stessa (es. tubazioni, sistema di degasaggio in linea, guarnizioni etc.) possono rilasciare i composti oggetto di analisi, è necessaria una cura particolare per ridurre le possibili contaminazioni da rilascio di queste sostanze. Anche solventi ad elevata purezza per uso cromatografico possono contenere tracce di analiti per rilascio da parte di polimeri fluorurati con cui sono venuti in contatto. L'uso di materiali in polimeri perfluorurati tipo politetrafluoroetilene (PTFE) deve essere evitato. È consigliabile testare i materiali prima del loro utilizzo riguardo a possibili contaminazioni del fondo analitico.

In particolare i contenitori per il campionamento devono essere di materiale inerte rispetto al campione; pertanto è meglio evitare tutte le plastiche fluoro polimeriche, inclusi fluoro elastomeri e PTFE sia per il campionamento che per lo stoccaggio. Si deve inoltre evitare l'uso di contenitori in vetro a causa di un possibile assorbimento degli analiti sulla superficie vetrosa.

L'uso di bianchi di processo è particolarmente importante per questi analiti, ma questo non può ovviare al problema della presenza di analiti rilasciati da componenti in fluoropolimero della strumentazione cromatografica o dai solventi utilizzati come eluenti cromatografici. La sostituzione, ove possibile, delle parti fluorurate con altri materiali può aiutare a ridurre, ma non ad eliminare completamente il problema. Per intercettare e ritardare gli eventuali analiti rilasciati dal sistema si raccomanda perciò di inserire tra la pompa LC e la valvola d'iniezione una cartuccia a fase inversa.

Va inoltre tenuta in considerazione la pulizia della vetreria utilizzata nella manipolazione del campione e nella preparazione degli standard di taratura: prima del loro impiego devono essere accuratamente lavati e risciacquati in successione con acqua ultrapura (6.1.1), e metanolo (6.1.5) esenti da tracce degli analiti.

Non usare detergenti per vetreria.

4. Prelievo e conservazione dei campioni

4.1. Prelievo dei campioni

Il prelievo dei campioni avviene secondo la norma ISO 5667- 3:2018 e ISO 5667-14:2014, nonché del metodo ISS.PGA.901.REV01. I campioni vengono prelevati in aliquote del volume minimo di 50 mL in una provetta di polipropilene (PP o HDPE) o in bottiglia di materiale plastico dotata di liner e tappo a vite.

4.2. Conservazione dei campioni

I tempi di conservazione sono di 2 settimane se il campione viene refrigerato alla temperatura di $4\pm 3^{\circ}\text{C}$. Tempi di conservazione più lunghi possono essere ottenuti tramite congelamento dell'aliquota e mantenimento della stessa a temperatura pari o inferiore a -18°C .

Data la stabilità chimica all'ossidazione degli analiti, non è necessario nessun trattamento specifico per le acque sottoposte a trattamento di potabilizzazione.

5. Apparecchiature

- (5.1) Cromatografo liquido ad alte prestazioni, preferibilmente UHPLC, abbinato a spettrometro di massa a triplo quadrupolo con sistema di ionizzazione elettrospray, eventualmente con sistema di arricchimento su fase solida in linea SPE on-line;
- (5.2) Micropipette manuali o elettroniche a pistone a volume variabile (es. 10-100 μL , 100-1000 μL) oppure microsiringhe con esattezza $\leq 1\%$;
- (5.3) Bilancia analitica $\pm 0,1$ mg;
- (5.4) Centrifuga da banco con velocità minima di circa 5000 giri al minuto.

6. Reagenti e materiali

6.1. Reagenti

- (6.1.1) Acqua ultrapura (vedi caratteristiche norma UNI EN ISO 3696:1995) o acqua ultrapura per LC-MS;
- (6.1.2) Acido Formico 98-100% MS additive grade;
- (6.1.3) Formiato d'ammonio MS additive grade;
- (6.1.4) Isopropanolo puro per LC-MS;
- (6.1.5) Metanolo puro per LC-MS;
- (6.1.6) Altre sostanze per facilitare i processi di ionizzazione in sorgente quali ammoniacca o fluoruro di ammonio, in funzione del metodo analitico strumentale utilizzato.

6.2. Materiali di riferimento

- (6.2.1) Miscela di standard PFAS in riferimento all'elenco di Tabella 1 (es. Wellington Lab PFAC-MCX native 2000 µg/L in metanolo);
- (6.2.2) Miscela di standard interni con PFAS marcati con isotopi stabili (SIL-IS) (es. ¹³C₄-PFBA, ¹³C₂-PFHxA, ¹³C₄-PFOA, ¹³C₅-PFNA, ¹³C₂-PFDA, ¹³C₂-PFUnDA, ¹³C₂-PFDODA, ¹⁸O₂-PFHxS, ¹³C₄-PFOS: purezza minimo 98%, es. Wellington Lab MPFAC-C-IS ILS 2000 µg/L in metanolo).

6.3. Materiali

- (6.3.1) Provette in materiale polietilene PE o polipropilene PP da 50 mL e da 10 mL;
- (6.3.2) *Vial* in polipropilene PP da 2 mL e/o *vial* in vetro da 10 mL;
- (6.3.3) Colonna per separazione cromatografica a fase inversa C18, pentafluorofenilica o con gruppo polare incorporato;
- (6.3.4) Colonna di preconcentrazione per SPE on-line a fase inversa con gruppo polare (es. Oasis™ HLB oppure Thermo Scientific Hypersil™ GOLD aQ) oppure a scambio anionico debole.

7. Procedimento

7.1. Preparazioni delle soluzioni di lavoro

Di seguito viene riportato una descrizione a titolo esemplificativo della preparazione delle soluzioni di standard.

7.1.1. Preparazione delle soluzioni concentrate di PFAS e di standard interni marcati MPFAS a 500 µg/L

- (7.1.1.1) Soluzione di PFAS a 500 µg/L: In un matraccio da 5 mL si prepara una soluzione di PFAS diluendo opportune quantità delle soluzioni certificate dei principi attivi singoli o in miscela (6.2.1) prelevando direttamente i volumi con una micropipetta tarata (5.2) e portando a volume con metanolo per LC-MS (6.1.5). La soluzione è stabile 12 mesi.
- (7.1.1.2) Soluzione di MPFAS a 500 µg/L: in un matraccio da 5 mL si prepara una soluzione di MPFAS diluendo opportune quantità delle soluzioni certificate dei principi attivi marcati singoli o in miscela (6.2.2) prelevando direttamente i volumi con una micropipetta tarata (5.2) e portando a volume con metanolo per LC-MS (6.1.5). La soluzione è stabile 12 mesi.

7.1.2. Preparazione delle soluzioni diluite di PFAS e di standard interni marcati MPFAS

- (7.1.2.1) Soluzione di PFAS a 2 µg/L: in un matraccio da 5 mL si prepara una soluzione diluita di PFAS prelevando con una micropipetta tarata (5.2) 20 µL di soluzione di PFAS a 500 µg/L (7.1.1.1) 1 mL di acido formico (6.1.2) e portando a volume con acqua per LC-MS (6.1.1). La soluzione si prepara ad ogni sessione analitica.
- (7.1.2.2) Soluzione di MPFAS a 2 µg/L: in un matraccio da 5 mL si prepara una soluzione diluita di MPFAS prelevando con una micropipetta tarata (5.2) 20 µL di soluzione di MPFAS a 500 µg/L (7.1.1.2), 1 mL di acido formico (6.1.2) e portando a volume con acqua per LC-MS (6.1.1). La soluzione si prepara ad ogni sessione analitica.

Solo per la modalità di analisi che prevede l'arricchimento in linea del campione (SPE on-line) si preparano:

- Soluzione di PFAS a 2 µg/L (7.1.2.1) in metanolo e non in acqua (senza acido formico);
- (7.1.2.3) Soluzione diluita di PFAS a 0,05 µg/L (50 ng/L) in una provetta monouso in PP prelevando con una micropipetta tarata (5.2) 250 µL di soluzione di PFAS a 2 µg/L (7.1.2.1) a cui si aggiungono 9750 µL di acqua per LC-MS (6.1.1). La soluzione viene preparata prima di ogni sessione analitica;
- (7.1.2.4) Soluzione diluita di MPFAS a 0,1 µg/L (100 ng/L) in una provetta monouso in PP prelevando con una micropipetta tarata (5.2) 250 µL di soluzione di MPFAS a 2 µg/L (7.1.2.2) a cui si aggiungono 950 µL di acido formico e 3800 di metanolo per LC-MS (6.1.5). La soluzione viene preparata prima di ogni sessione analitica.

7.1.3. Preparazione degli standard di taratura

- Curva di taratura per iniezione diretta: Le soluzioni standard per la retta di taratura in iniezione diretta sono almeno 5 in un intervallo 0,002-2 µg/L. Tutte le diluizioni si effettuano con acqua per LC-MS (6.1.1) e vanno ripreparate ad ogni sessione analitica.
- Curva di taratura arricchimento in SPE on-line: Le soluzioni standard per la retta di taratura sono almeno 5 in un intervallo 0,2-5 ng/L. Esse si preparano direttamente nelle *vial* da 10 mL. I volumi vengono prelevati con micropipette tarate (5.2). Tutte le diluizioni si effettuano con acqua per LC-MS (6.1.1) e vanno ripreparate ad ogni sessione analitica.

7.2. Preparazione del campione

- Modalità iniezione diretta. In una *vial* da 2 mL si pongono 50 µL di soluzione standard di MPFAS a 2 µg/L (7.1.2.1) e 1 mL di campione. La *vial* viene agitata e sottoposta ad analisi LC-MS. Contestualmente alla preparazione dei campioni oggetto di indagine, ad ogni sessione analitica preparare nello stesso modo anche un bianco, ovvero una *vial* contenente acqua per LC-MS (6.1.1).
- Modalità SPE on-line. In una *vial* da 10 mL si pongono 50 µL di soluzione standard di MPFAS a 0,05 µg/L (7.1.2.4) e 10 mL di campione. Contestualmente alla preparazione dei campioni oggetto di indagine, ad ogni sessione analitica è consigliabile preparare nello stesso modo anche un bianco, ovvero una *vial* contenente acqua per LC-MS (6.1.1).

Si consiglia, prima di aggiungere l'aliquota di prova della necessaria quantità di riferimento interno isotopicamente arricchito di ridurre la quantità di particolato eventualmente presente. Tale risultato può essere raggiunto tramite centrifugazione (es. sottoponendo ad un ciclo di circa 5 minuti ad almeno 5000 giri al minuto e quindi prelevando il surnatante) (5.4).

7.3. Misura strumentale mediante cromatografo liquido accoppiato ad uno spettrometro di massa MSMS

L'analisi strumentale si effettua con sistema LC-MSMS con sistema di ionizzazione elettrospray in modalità negativa e rivelazione in modalità *Multiple Reaction Monitoring* (MRM).

In allegato I si riportano, a titolo di esempio, condizioni cromatografiche e strumentali a cui fare riferimento.

8. Calcolo ed espressione del risultato

8.1. Analisi qualitativa

L'identificazione e la quantificazione degli analiti avvengono sulla base del tempo di ritenzione e delle transizioni di massa caratteristiche per ciascun PFAS (Tabella 2). Questi valori devono essere considerati come indicativi, poiché sono dipendenti dalla strumentazione utilizzata.

Tabella 2. Parametri di acquisizione dell'analizzatore MSMS (Q1= primo quadrupolo (ione precursore); Q3= terzo quadrupolo (ione frammento)).

Analita	Q1	Q3
PFBA	213	169
4 ¹³ C-PFBA	217	172
PFPeA	263	219
3 ¹³ C-PFPeA	266	222
PFBS 1	299	80
PFBS 2	299	99
PFHxA	313	269
¹³ C ₂ -PFHxA	315	270
PFHxS 1	399	80
PFHxS 2	399	99
¹⁸ O ₂ -PFHxS 1	403	84

Analita	Q1	Q3
¹⁸ O ₂ -PFHxS 2	403	103
PFHpA	363	319
PFHpS 1	449	80
PFHpS 2	449	99
PFOA 1	413	369
PFOA 2	413	169
PFOA 3	413	219
¹³ C ₄ -PFOA	417	372
PFOS 1	499	80
PFOS 2	499	99
¹³ C ₄ -PFOS 1	503	80
¹³ C ₄ -PFOS 2	503	99
PFNA	463	419
¹³ C ₅ -PFNA	468	423
PFDeA	513	469
¹³ C ₂ -PFDeA	515	470
PFUnA	563	519
¹³ C ₂ -PFUnA	565	520
PFDoA	613	569
¹³ C ₂ -PFDoA	615	570
4:2 FTS	327	307
4:2 FTS	327	81
6:2 FTS	427	407
6:2 FTS	427	81
8:2 FTS	527	507
8:2 FTS	527	81
HFPO-DA	329	285
HFPO-DA	329	169
cC6O4 1	339	179
cC6O4 2	339	113

8.2. Analisi quantitativa

L'analisi quantitativa si basa sul confronto dei rapporti di aree tra i picchi di un composto presente in un campione e il corrispondente composto marcato addizionato prima dell'analisi con quelle di uno o più standard acquisiti nella stessa modalità.

Ogni analita viene quindi dosato quantitativamente in base al valore dell'area relativa (rapporto tra quella del picco d'interesse e quella dello standard interno).

Per ogni analita da quantificare, da solo o in miscela, possono essere preparate soluzioni di taratura a concentrazione nota, ottenendo così una relazione che correla le aree con la quantità introdotta.

La taratura è ottenuta costruendo una curva multilivello con interpolazione lineare. A scopo di una prima valutazione della accettabilità di tale curva può essere valutato il valore del coefficiente di correlazione (r^2) che dovrebbe essere quanto più possibile vicino ad un valore unitario.

L'equazione della retta di regressione viene calcolata in automatico dal software dello strumento sulla base del rapporto tra area del picco dell'analita A^{analita} e l'area dello standard interno marcato $A^{\text{S}^{\text{analita}}}$ associato a quell'analita:

dove a = coefficiente angolare; b = termine noto

Qualora non sia disponibile lo specifico standard isotopicamente marcato di un analita, quest'ultimo si deve quantificare con lo standard marcato di un'altra molecola, che sia strutturalmente simile. A titolo esemplificativo si riportano in tabella 3 le associazioni standard interno marcato/analita.

Tabella 3. Elenco degli analiti e dei corrispondenti standard interni marcati

Analita	Standard interno marcato
PFBA	¹³ C ₄ -PFBA
PFBS	¹⁸ O ₂ -PFHxS
PFPeA	¹³ C ₃ -PFPeA
PFHxA	¹³ C ₂ -PFHxA
PFHxS	¹⁸ O ₂ -PFHxS
PFHpA	¹³ C ₄ -PFOA
PFHpS	¹³ C ₄ -PFOS
PFOA	¹³ C ₄ -PFOA
PFOS	¹³ C ₄ -PFOS
PFNA	¹³ C ₅ -PFNA
PFDeA	¹³ C ₂ -PFDeA
PFUnA	¹³ C ₂ -PFUnA
PFDoA	¹³ C ₂ -PFDoA
4:2 FTS	¹⁸ O ₂ -PFHxS
6:2 FTS	¹⁸ O ₂ -PFHxS
8:2 FTS	¹³ C ₄ -PFOS
HFPO-DA	¹³ C ₄ -PFOA
cC6O4	¹³ C ₂ -PFHxA

Una volta costruite le rette di taratura la concentrazione di analita $C_{analita}$ nel campione in $\mu\text{g/L}$ viene calcolata nel seguente modo:

$$C_{analita}^{\text{campione}} = \frac{\left(\frac{A^{analita}}{A^{S_{analita}}} - b \right)}{a}$$

dove $A^{analita}/A^{S_{analita}}$ è il rapporto tra l'area del picco di un analita nel campione e l'area dello standard interno marcato associato a quell'analita.

Gli isomeri br-PFOA e br-PFOS (*branched*, isomeri ramificati) vengono quantificati sulla base delle curve di taratura rispettivamente di PFOA e PFOS (isomeri lineari) e vengono espressi rispettivamente come PFOA e PFOS (isomeri lineari).

Nel caso il campione risulti per un determinato analita fuori dall'intervallo di taratura sarà necessario diluire il campione.

Se un analita è identificato da più transizioni di massa, la concentrazione si può esprimere come media delle concentrazioni di tutte le transizioni di massa associate a quell'analita.

9. Prestazioni del metodo

Il laboratorio dovrà verificare l'applicazione del metodo di prova prima di eseguire le analisi sui campioni. Nella Parte C "Caratteristiche di prestazione dei metodi ISS", si riportano in tabella dedicata i risultati dell'applicazione del presente metodo di prova in un laboratorio.

Bibliografia

- Environmental Protection Agency. *Method 537, Determination of selected perfluorinated alkyl acids in drinking water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MSMS), Version 1.1.* Washington, DC: U.S. EPA; 2009.
- Environmental Protection Agency., *Technical Advisory 815-B-16-021 – Laboratory Analysis of Drinking Water samples for Perfluorooctanoic Acid (PFOA) Using EPA Method 537 Rev 1.1.* Washington, DC: U.S. EPA; 2016.
- ISO 5667-3:2018. *Water quality - Sampling - Part 3: Preservation and handling of water samples.* Geneva: International Organization for Standardization; 2018.
- ISO 25101:2009. *Water quality - Determination of perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) - Method for unfiltered samples using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry.* Geneva: International Organization for Standardization; 2009.
- Organization for Economic Co-operation and Development.. *Toward a new comprehensive global database of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): summary report on updating the OECD 2007 list of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS).* Paris: OECD; 2018. (OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Risk Management No. 39, ENV/JM/MONO(2018)7)
- Valsecchi S, Mazzoni M, Polesello S. Analisi multiresiduale LC-MS mediante arricchimento in linea del campione (on-line SPE/UHPLC-ESI-MSMS) per la determinazione di acidi perfluoroalchilcarbossilati e perfluoroalchilsolfonati nelle acque dolci naturali. *Notiziario dei Metodi analitici dell'Istituto di Ricerca sulle Acque* 2013;1:2-12.

Allegati al metodo ISS.CBA.052.Rev00

A1. Condizioni strumentali esemplificative

Iniezione diretta:

- Colonna di separazione: Supelco Ascentis Express™ RP-Amide (dimensione delle particelle: 2,7 µm; diametro interno x lunghezza: 2,1 mm x 150 mm);
- Colonna di guardia: Xterra™ MS C18 (2,5 µm; 2,1 mm x 5 mm);
- Fase mobile A: H₂O per LC-MS + 25 µL/L di acido formico + 380 mg/L formiato d'ammonio;
- Fase mobile B: MeOH;
- Flusso: 0,35 mL/min;
- Volume iniettato: 100 µL (iniezione diretta);
- Durata della corsa: circa 15 min con il seguente gradiente di fasi A e B

Esempio di gradiente cromatografico per analisi UHPLC-MS dopo iniezione diretta

Tempo (min)	Fase mobile A	Fase mobile B
1	90	10
2	50	50
12	10	100
14	0	100

Arricchimento in linea (SPE on-line):

- Colonna di preconcentrazione: Oasis™ HLB (20 µm; 2,1 mm x 30 mm);
- Colonna di separazione: Supelco Ascentis Express™ RP-Amide (2,7 µm; 2,1 mm x 150 mm)
- Colonna di guardia: Xterra™ MS C18 (2,5 µm; 2,1 mm x 5 mm)
- Fase mobile A: H₂O per LC-MS + 25 µL/L di acido formico + 380 mg/L formiato d'ammonio;
- Fase mobile B: MeOH;
- Flusso della pompa analitica: 0,35 mL/min;
- Volume iniettato: 5 mL (SPE on-line);
- Durata della corsa: circa 15 min con il gradiente secondo la tabella seguente:

Esempio di gradiente cromatografico per preconcentrazione in linea e analisi UHPLC-MS

Tempo	Pompa analitica		Pompa di preconcentrazione	
	A%	B%	flusso (mL/min)	A%
0,00	95	5	0,5	100
11,00	95	5	0,5	100
11,20	95	5	1	100
12,00	50	50	1	100
16,00	Switch SPE on-line Valve			
20,00	0	100	1	100
20,50	0	100	1	100
21,00	0	100	0,5	100
24,00	0	100	0,5	100
24,50	95	5	0,5	100

I parametri di acquisizione dello spettrometro di massa, operante in MRM con ionizzazione elettrospray negativa, sono riportate nella tabella seguente per lo spettrometro Sciex6500. La temperatura della sorgente è 400 °C con un potenziale al capillare di -4500 V.

Parametri di acquisizione dello spettrometro di massa

Analita	DP	EP	CE	CXP
PFBA	-15	-10	-14	-12
¹³ C ₄ -PFBA	-15	-10	-14	-12
PFPeA	-10	-10	-11	-6
¹³ C ₃ -PFPeA	-10	-10	-11	-6
PFBS	-61	-10	-64	-10
PFBS	-61	-10	-36	-10
PFHxA	-20	-10	-13	-9
¹³ C ₂ -PFHxA	-20	-10	-13	-9
PFHxS	-100	-10	-85	-6
PFHxS	-100	-10	-60	-6
¹⁸ O ₂ -PFHxS	-100	-10	-85	-6
¹⁸ O ₂ -PFHxS	-100	-10	-44	-6
PFHpA	-10	-10	-15	-10
PFHpS	-80	-10	-89	-10
PFHpS	-80	-10	-64	-9
PFOA	-20	-10	-16	-9
PFOA	-35	-10	-20	-9
PFOA	-35	-10	-8	-9
¹³ C ₄ -PFOA	-20	-10	-15	-9
PFOS	-85	-10	-95	-9
PFOS	-85	-10	-75	-9
¹³ C ₄ -PFOS	-85	-10	-95	-9
¹³ C ₄ -PFOS	-85	-10	-75	-9
PFNA	-20	-10	-15	-10
¹³ C ₅ -PFNA	-20	-10	-15	-10
PFDeA	-20	-10	-15	-10
¹³ C ₂ -PFDeA	-20	-10	-15	-10
PFUnA	-15	-10	-18	-10
¹³ C ₂ -PFUnA	-15	-10	-18	-10
PFDoA	-25	-10	-20	-15
¹³ C ₂ -PFDoA	-25	-10	-20	-15
4:2 FTS	-70	-10	-33	-9
4:2 FTS	-70	-10	-55	-4
6:2 FTS	-70	-10	-33	-9
6:2 FTS	-70	-10	-65	-4
8:2 FTS	-70	-10	-40	-9
8:2 FTS	-70	-10	-70	-4
HFPO-DA	-18	-10	-9	-5
HFPO-DA	-10	-10	-11	-10
cC6O4	-10	-10	-9	-9
cC6O4	-10	-10	-15	-10

DP= declustering potential; EP= entrance potential; CE = collision energy; CXP= collision cell exit potential

ISS.CBC.001.REV00

GLIFOSATO, AMPA E GLUFOSINATO: METODO IC-HRMS (INIEZIONE DIRETTA)

0. Generalità e introduzione

Il glifosato o N-fosfonometil-glicina è uno degli erbicidi più usati al mondo. Prodotto a partire dagli anni '70, deve la sua enorme popolarità alla sua grande efficacia. Esso agisce infatti in maniera sistemica sull'inibizione dell'enzima la EPSP-sintasi nei vegetali, indispensabile per la sintesi degli aminoacidi, poiché una volta penetrato, il principio attivo si muove verso i punti di attiva crescita, causando la morte della pianta. Il glifosato risulta un diserbante a larghissimo spettro soprattutto per quanto riguarda gli infestanti più persistenti.

Il glifosato per la sua elevata solubilità in acqua (10 g/L a 20°C) potrebbe raggiungere le acque superficiali (laghi e fiumi) e sotterranee (acque di falda). Il glifosato, nell'ambiente, è degradato dai batteri principalmente ad AMPA e ad anidride carbonica. L'AMPA è ancora microbiologicamente degradabile con nuova liberazione di anidride carbonica. La degradazione avviene più rapidamente in condizioni aerobiche anziché anaerobiche. Il tempo di emivita nel terreno varia da alcuni giorni a diversi mesi; nell'acqua è stato misurato tra 12 ore e 7 giorni.

L'analisi strumentale di queste molecole risulta però difficoltosa a causa delle loro caratteristiche chimico-fisiche. L'elevata polarità, la bassa volatilità, le piccole dimensioni di tali molecole, il comportamento zwitterionico e il facile complessamento con ioni metallici, rappresentano i maggiori ostacoli per la determinazione attraverso le usuali metodiche, specialmente se si vuole arrivare a limiti di quantificazione strumentale dell'ordine dei ng/L (concentrazioni tipiche della maggior parte dei pesticidi normati nelle acque). Le attuali metodiche analitiche per la determinazione del glifosato nelle acque prevedono l'utilizzo di tecniche cromatografiche (tipicamente GC o LC) accoppiate alla spettrometria di massa.

1. Campo di applicazione

Il presente metodo di prova consente la determinazione di residui di glifosato, Acido aminometilfosfonico (AMPA) e glufosinato in campioni di acqua potabile, destinata al consumo umano, minerale, sotterranea e superficiale.

Il metodo non è applicabile alle acque di mare e acque ad alto contenuto salino.

Il documento Sanco 825/00 rev 8.1 al paragrafo 6.3 riporta: "A condizione che un metodo sia stato validato con successo per le acque superficiali al LOQ richiesto per l'acqua potabile, non è necessaria alcuna ulteriore convalida nell'acqua potabile."

Le eventuali particelle in sospensione nei campioni di acqua vengono rimosse mediante filtrazione.

Per tutti gli analiti citati il metodo è applicabile per valori di concentrazione a partire da 0,02 µg/L (limite di quantificazione).

2. Principio del metodo

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di sfruttare le potenzialità analitiche della strumentazione attualmente in commercio per riuscire a determinare glifosato, AMPA e glufosinato per iniezione diretta, quindi senza alcun tipo di derivatizzazione e/o preconcentrazione, arrivando ad un limite di quantificazione strumentale dell'ordine dei ng/L, indispensabile per garantire il rispetto dei limiti normativi dei principali pesticidi analizzati nelle acque potabili, minerali, superficiali e sotterranee. L'obiettivo è stato sviluppato focalizzando lo studio principalmente in due ambiti, ossia la separazione cromatografica migliore possibile dei composti e un'efficiente rivelazione dei medesimi con un detector in grado di quantificarli correttamente a concentrazioni dell'ordine dei ng/L (nello specifico almeno a 20 ng/L). Per quanto riguarda la separazione cromatografica si è scelto un cromatografo ionico ad alta pressione (HPIC) con colonna di separazione anionica, date le caratteristiche polari delle molecole da analizzare e il tipo di gruppi funzionali presenti su di esse. Relativamente alla rilevazione, invece, è stato impiegato uno spettrometro di massa ad alta risoluzione, per poter isolare le masse desiderate con esattezza e precisione anche a bassissime concentrazioni.

3. Interferenze e causa di errore

Il glifosato, Ampa e glufosinate necessitano di un'efficiente separazione dagli anioni presenti nella matrice, nella fattispecie cloruri, solfati e nitrati, in quanto nelle acque potabili sono presenti nell'ordine dei mg/L (6 ordini di grandezza in più degli analiti da ricercare) e potrebbero essere fonte di interferenza. In questo tipo di tecnica infatti, l'eluente in uscita dalla cella conduttimetrica dell'IC viene inviato direttamente al detector di massa dell'IC; qui viene ionizzato in forma di *electrospray* ed entra nel selettore quadrupolare. La presenza di anioni in grosse quantità rispetto agli analiti anionici di interesse crea dei problemi nella fase di ionizzazione in quanto anioni come cloruri e solfati coeluenti ad AMPA e glifosato "mascherano" questi ultimi, presenti in tracce nella corrente ionica che entra nel detector di massa, sottraendoli alla determinazione.

4. Procedure di campionamento

Il prelievo e la successiva conservazione dei campioni avviene secondo la norma ISO 5667-3:2012.

I tempi di conservazione, indicati in Tabella A1 della norma ISO 5667-3:2012, sono di 6 giorni se il campione viene refrigerato e di 1 mese se il campione viene congelato a -20°C.

Nel caso di un campione congelato, prima di procedere alle operazioni analitiche, le aliquote di prova vengono scongelate mantenendole a temperatura ambiente per circa 24 ore.

I campioni vengono prelevati in aliquote da 50 mL in una provetta di polipropilene (6.3.1). Per le acque clorate, all'atto del prelievo, aggiungere per ciascun campione 200 µL di soluzione allo 0,6% di tiosolfato di sodio (6.1.1).

5. Apparecchiature

- (5.1) Cromatografo ionico ICS- 5000⁺ Thermo Scientific™ o altro strumento IC di prestazioni equivalenti;
- (5.2) Detector MS ad alta risoluzione Orbitrap™ Q Exactive Focus™, con sorgente HESI II, Thermo Scientific™ o altro strumento HRMS di prestazioni equivalenti;
- (5.3) Pompa ausiliaria AXP-MS, Thermo Scientific o altro strumento di prestazioni equivalenti.

6. Reagenti e materiali

6.1. Reagenti

- (6.1.1) Sodio Tiosolfato pentaidrato per analisi preparato in una soluzione allo 0,6%;
- (6.1.2) Acqua ultrapura con le caratteristiche previste dalla norma UNI EN ISO 3696;
- (6.1.3) Soluzione eluente di KOH: Il cromatografo ionico viene alimentato solamente con acqua ultrapura e l'eluente viene preparato direttamente dallo strumento, alle concentrazioni e gradienti stabiliti, per diluizione di una soluzione concentrata di KOH presente in una cartuccia al suo interno (Sistema Reagent Free; RFIC).

6.2. Materiali di riferimento

- (6.2.1) Glifosato, AMPA e glufosinato in soluzione acquosa 100 µg/mL per la costruzione della retta di taratura;
- (6.2.2) 1,2-¹³C₂-¹⁵N-glifosato 97% 100 µg/mL;
- (6.2.3) Glifosato, AMPA e glufosinato in soluzione acquosa 100 µg/mL, di origine differente da quelli precedenti, utilizzati come check di controllo per verificare l'esattezza.

6.3. Materiali

- (6.3.1) Provette in materiale polietilene PE o polipropilene PP da 50 mL e da 10 mL;
- (6.3.2) Vetreria di classe A;
- (6.3.3) Filtri 13 mm 0,2 µm GHP o equivalenti;
- (6.3.4) Siringhe in (PE) o (PP);
- (6.3.5) Colonna di separazione anionica AS11HC 2mm o altra con prestazioni almeno equivalenti;
- (6.3.6) Soppressore ASRS 300 2 mm o altro con prestazioni almeno equivalenti.

7. Procedimento

7.1. Preparazione del campione

L'analisi avviene per iniezione diretta nella colonna del cromatografo ionico. La quantità da iniettare dipende dal loop di iniezione in dotazione.

7.2. Misura strumentale mediante cromatografo ionico accoppiato al sistema ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione

L'analisi strumentale viene effettuata mediante cromatografia ionica abbinata ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione.

7.2.1. Condizioni cromatografiche

L'analisi avviene indicativamente alle seguenti condizioni cromatografiche:

- Flusso eluente KOH: 0,25 mL/min
- Gradiente: eluizione isocratica 15 mM per 6,5 min, gradiente fino a 45 mM in 5,5 min, eluizione isocratica 45 mM per 8 minuti ed equilibrio per 5 minuti a 15 mM
- Il sistema necessita di una pompa aggiuntiva per fornire acqua ultrapura, con un flusso di 0,30 mL/min, necessaria alla rigenerazione del soppressore in quanto il flusso di eluente in uscita dalla cella conduttimetrica, non torna al soppressore come rigenerante ma viene inviato alla sorgente del detector di massa per la sua vaporizzazione/ionizzazione.

7.2.2. Condizioni dello spettrometro di massa

Si riportano, quale esempio, le seguenti condizioni con l'apparecchiatura di cui al punto 5:

- Ionizzazione negativa con analisi MSMS (PRM) dei frammenti originati dai precursori anionici di glifosato, AMPA e glufosinato (rispettivamente 168,0067, 110,0012 e 180,0431 [m/z]). In particolare, dopo aver trovato l'energia di collisione più favorevole in cella HCD (NCE = 80), si individua come frammento più abbondante, da utilizzare per la quantificazione, il gruppo PO₂, m/z 62,9614 per tutte e tre le molecole
- Risoluzione del detector: 70000 a 200 m/z
- Sheath gas: 50 a.u.
- Aux gas: 20 a.u.
- Voltaggio: 3,5 kV
- Capillary Temp.: 300°C
- Aux heater Temp.: 380°C

8. Calcolo ed espressione del risultato

8.1. Analisi qualitativa

Con uno spettrometro di massa ad alta risoluzione si ha la conferma qualitativa dell'identificazione dell'analita tramite i seguenti criteri:

- Tempo di ritenzione (Tr): costituisce il criterio più semplice di riconoscimento dell'analita nel campione. Infatti il Tr, a parità di condizioni cromatografiche, deve corrispondere a quello dello standard di taratura, all'interno di una finestra che tiene conto anche del potere di risoluzione del sistema cromatografico.
- Massa degli analiti: lo spettrometro di massa ad alta risoluzione deve rivelare la presenza dei seguenti analiti con risoluzione di almeno 5 ppm e 4 cifre decimali
 - Glifosato [m/z]: 168,0067
 - AMPA [m/z]: 110,0012
 - Glufosinate[m/z]: 180,0431
- Frammenti degli analiti: lo spettrometro di massa ad alta risoluzione deve rivelare la presenza dei seguenti frammenti MS2 con risoluzione di almeno 5 ppm e 4 cifre decimali
 - PO₂ [m/z]: 62,9614
 - PO₃ [m/z]: 78,9590
- Altra tecnica di identificazione è il metodo delle aggiunte: si basa sull'arricchimento del campione con una piccola quantità di sostanza attiva nota, della quale si vuole escludere o meno la presenza.

8.2. Analisi quantitativa

L'analisi quantitativa si basa sul confronto delle aree dei picchi di un composto presente in un campione con quelle di uno o più standard.

A discrezione del laboratorio, può ritenersi opportuno l'utilizzo di 1,2-¹³C₂-¹⁵N-glifosato o altri standard interni.

Ogni analita viene dosato quantitativamente in base al valore dell'area o dell'area relativa (rapporto tra quella del picco d'interesse e quella dello standard interno).

Per ogni analita da quantificare, da solo o in miscela, possono essere preparate soluzioni di taratura a concentrazione nota, ottenendo così una relazione che correla le aree con la quantità introdotta.

La taratura è ottenuta costruendo una curva multilivello.

In Allegato A1 si riportano esempi di applicazione, alla concentrazione di 0,02 µg/L, per il glifosato, ampa e glufosinate assieme alle relative rette di taratura.

9. Prestazioni del metodo

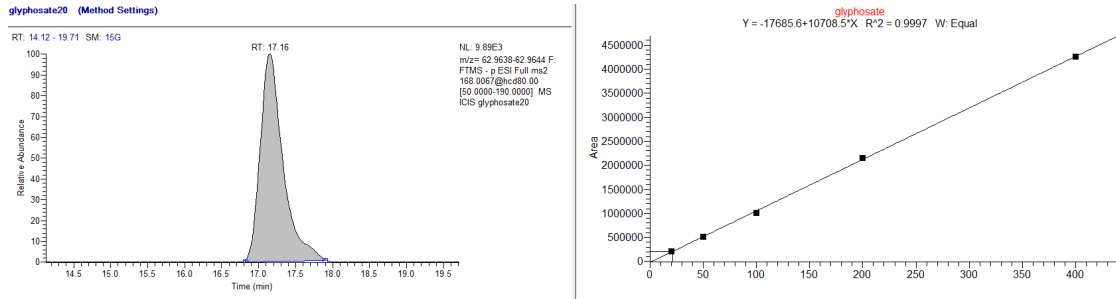
Il laboratorio dovrà verificare l'applicazione del metodo di prova prima di eseguire le analisi sui campioni (validazione). Negli Allegati A2 e A3 si riportano i risultati dell'applicazione del presente metodo di prova in due diversi laboratori.

Bibliografia

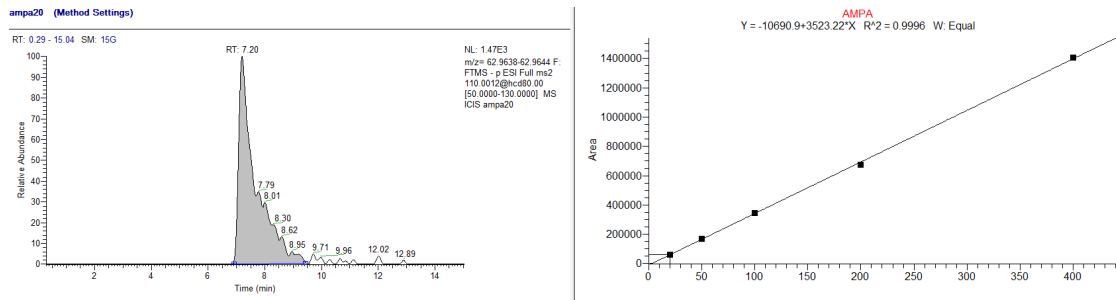
- Canadian Council of Ministers of the Environment. *Scientific criteria document for the development of the Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life–glyphosate*. Winnipeg: CCME; 2012.
- Direzione generale della Salute e della sicurezza alimentare della Commissione europea. *SANCO/825/00 rev. 8.1 del 16 novembre 2010, Guidance document on pesticide residue analytical methods*. Bruxelles: DG SANV; 2010.
- ISO 5667-3:2012. *Qualità dell'acqua-Campionamento - Parte 3: conservazione e manipolazione dei campioni di acqua*. Geneva: International Organization for Standardization; 2012.
- Italia. Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della Direttiva 98/83/Ce relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 52, 3 marzo 2001.
- Italia. Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152 e s.m.i: Norme in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 88, 14 aprile 2006.
- Italia. Decreto Ministero della Salute del 6 luglio 2017. Proroga dell'entrata in vigore del decreto 14 novembre 2016, recante Modifiche all'allegato I del decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31, recante: "Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano". *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 164, 15 luglio 2017.
- Yang C, Henday S, Wang L, Schnute B. *Analysis of Glyphosate and AMPA in Environmental Water by Ion Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry (IC-ESI-MSMS)*. Waltham, MA: Thermo Fisher Scientific™; 2010. (Application note: 491)

Allegati al metodo ISS.CBC.001.rev01

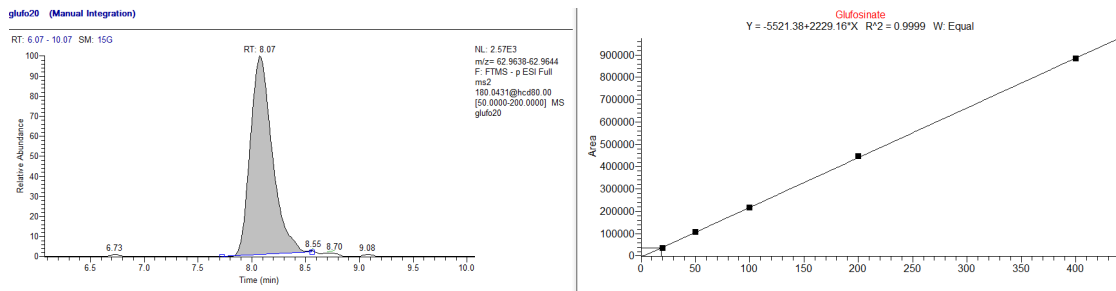
A1. Esempi di curve di calibrazione



GLIFOSATO: cromatogramma con i picchi relativi al punto più basso di curva per tutti gli analiti (20 ng/L) e curva di calibrazione



AMPA: cromatogramma con i picchi relativi al punto più basso di curva per tutti gli analiti (20 ng/L) e curva di calibrazione



GLUFOSINATO: cromatogramma con i picchi relativi al punto più basso di curva per tutti gli analiti (20 ng/L) e curva di calibrazione

A2. Risultati dell'applicazione del metodo di prova in un laboratorio

A titolo di esempio si riportano i risultati dell'applicazione del presente metodo in un laboratorio. Le prove di validazione del metodo in termini di esattezza e ripetibilità per quanto riguarda gli analiti sono state eseguite come di seguito descritto:

- 10 prove di ripetibilità su matrice reale ad una concentrazione prossima al limite di quantificazione (LoQ).
- 10 prove di ripetibilità su matrice reale ad una concentrazione prossima al 50% del valore di parametro del DL.vo 31/2001.
- 10 prove di ripetibilità su matrice reale ad una concentrazione prossima al valore di parametro del DL.vo 31/2001.
- 10 prove di ripetibilità su matrice reale ad una concentrazione superiore al valore di parametro del DL.vo 31/2001
- 10 prove di recupero su campione reale con aggiunta nota di 100 ng/L di glifosato, AMPA e glufosinato.

I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle seguenti.

GLIFOSATO: valutazione della precisione su campioni reali a vari livelli di concentrazione

Indicatore statistico	Campioni con concentrazione prossima			Campione con concentrazione
	al 0,02 µg/L (LOQ)	a 0,05 µg/L	a 0,10 µg/L	superiore a 0,10 µg/L
Media	19,4	42,4	86,9	311,4
STD	2,3	5,4	5,3	9,0
CV%	11,8	12,8	6,1	2,9

AMPA: valutazione della precisione su campioni reali a vari livelli di concentrazione

Indicatore statistico	Campioni con concentrazione prossima			Campione con concentrazione
	al 0,02 µg/L (LOQ)	a 0,05 µg/L	a 0,10 µg/L	superiore a 0,10 µg/L
Media	16,0	49,4	92,6	400,6
STD	2,1	5,9	7,7	5,7
CV%	13,5	12,0	8,4	1,4

GLUFOSINATO: valutazione della precisione su campioni reali a vari livelli di concentrazione

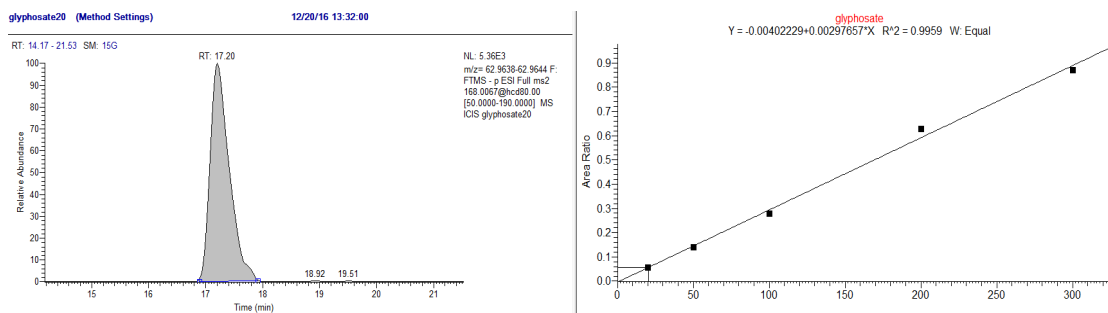
Indicatore statistico	Campioni con concentrazione prossima			Campione con concentrazione
	al 0,02 µg/L (LOQ)	a 0,05 µg/L	a 0,10 µg/L	superiore a 0,10 µg/L
Media	18,0	45,4	86,9	402,1
STD	1,6	3,6	4,5	6,9
CV%	9,0	7,9	5,2	1,7

Prove di recupero su campioni reali con aggiunta nota di 100 ng/L degli analiti

Indicatore statistico	Glifosato		AMPA		Glufosinato	
	Campione tq (ng/L)	Campione tq + 100 (ng/L)	Campione tq (ng/L)	Campione tq + 100 (ng/L)	Campione tq (ng/L)	Campione tq + 100 (ng/L)
media	26,8	116,8	118	212,7	85,8	181,2
recupero	-	92,1	-	94,7	-	95,4
stdev	1,1	2,9	3,1	4,4	1,9	3,5
CV%	4,2	2,5	2,6	2,1	2,2	1,9

Sono state eseguite inoltre delle prove utilizzando lo standard interno $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glifosato.

Viene riportata la retta di taratura concentrazione vs Area Ratio, il picco in corrispondenza del primo punto di curva e la Tabella riepilogativa con le prove di precisione e recupero su matrice reale.



GLIFOSATO: prove di verifica dell'esattezza mediante aggiunte note su matrice reale utilizzando per la quantificazione, lo standard interno marcato ¹³C₂, ¹⁵N-glifosato

GLIFOSATO: prove di recupero su campioni reali con aggiunta nota di 100 ng/L del glifosato. Quantificazione con standard marcato.

Indicatore statistico	Glifosato + 100 ppt ¹³ C ₂ , ¹⁵ N-glifosato	
	Campione tq (ng/L)	Campione tq + 100 (ng/L)
media	23,7	112,4
recupero	-	90,9
STD	0,9	3,1
CV%	4,0	2,8

**A3. Risultati dell'applicazione del metodo di prova in un altro laboratorio.
Riassunto dei risultati di validazione***

Analita	Incremento teorico (µg/L)	Media**	n	S	CV%	R%	Ue%
AMPA	0,030	0,0288	6	0,0039	13,60	96,1	10
	0,100	0,0975	6	0,0059	6,04	97,5	12
	0,250	0,2437	6	0,0116	4,75	97,5	-
	0,500	0,5082	6	0,0091	1,78	101,6	-
	5,000	4,6817	6	0,2189	4,68	93,6	-
	0,030	0,0293	6	0,0015	5,11	97,8	17
	0,100	0,0938	6	0,0042	4,49	93,8	15
Glifosato	0,250	0,2548	6	0,0117	4,59	101,9	-
	0,500	0,5068	6	0,0042	0,82	101,4	-
	5,000	4,8617	6	0,2096	4,31	97,2	-
	0,030	0,0322	6	0,0013	4,10	107,2	17
	0,100	0,0867	6	0,0022	2,49	86,7	13
Glufosinato	0,250	0,2302	6	0,0070	3,05	92,1	-
	0,500	0,4907	6	0,0092	1,86	98,1	-
	5,000	5,0042	6	0,0890	1,78	100,1	-

* validazione condotta anche oltre il valore di parametro previsto dalla normativa vigente in materia

**media delle 6 ripetizioni in condizioni di ripetibilità

ISS.CBA.053.REV00

MICROCISTINE: METODO LC-MSMS

0. Generalità e definizioni

L'utilizzo di acque superficiali da destinare al consumo umano può comportare alcune problematiche di carattere sanitario legate alla presenza di cianobatteri. Questi ultimi, noti anche come alghe verde-azzurre, sono batteri fotosintetici Gram-negativi, caratterizzati da un'elevata variabilità morfologica (forma unicellulare, coloniale, filamentosa) e dimensionale (da organismi unicellulari con diametro $< 1 \mu\text{m}$ a forme filamentose di lunghezza fino a qualche mm).

La presenza e proliferazione di cianobatteri è frequente in bacini lacustri, bacini di stoccaggio artificiale e serbatoi naturali che presentino condizioni caratterizzate da un'elevata irradiazione e temperatura, bassa turbolenza, alta concentrazione di nutrienti.

La rilevanza igienico-sanitaria dei fenomeni di diffusione di cianobatteri in acque da destinare a consumo umano è connessa alla capacità, da parte di alcune specie, di produrre metaboliti tossici (cianotossine) potenzialmente trasferibili all'uomo anche attraverso il consumo di acqua contaminata. Più di cinquanta specie di cianobatteri sono riconosciute come tossiche, tra i generi maggiormente coinvolti nella produzione di cianotossine figurano *Microcystis*, *Nodularia*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Cylindrospermopsis*.

Le cianotossine ad oggi identificate, si differenziano in base al loro meccanismo d'azione in:

- epatotossine (microcistine e nodularine), hanno la capacità di inibire le fosfatasi PP1 e 2A, con conseguente iperfosforilazione proteica a livello del citoscheletro degli epatociti; l'ingestione sistematica di tali tossine è correlata a fenomeni di infiammazione e degenerazione degli epatociti;
- neurotossine (anatotossine e saxitossine), agiscono sul sistema neuromuscolare, bloccando la trasmissione nervosa attraverso differenti meccanismi;
- citotossine (cilindrospermopsina), agiscono a livello di diversi organi bersaglio come inibitori della sintesi proteica;
- dermatotossine (lyngbyatossina A, aplysiatossina e lipopolisaccaridi), causano irritazione della pelle e delle mucose inibendo la sintesi proteica.

Le cianotossine presenti in un corpo idrico sono principalmente contenute all'interno delle cellule produttrici (frazione intracellulare di tossine); tuttavia elevate concentrazioni di tossine possono essere rilasciate in acqua soprattutto a seguito di senescenza e lisi cellulare (frazione extracellulare o libere libere di tossine).

Il rischio associato alla presenza di cianotossine nelle acque destinate al consumo umano può essere notevolmente ridotto mediante rimozione o filtrazione delle biomasse algali presenti nelle acque, mentre l'utilizzo di trattamenti con agenti ossidanti (es. cloro od ozono) responsabili di lisi cellulare potrebbe aumentare il rilascio degli agenti tossici in forma libera all'interno del corpo idrico e di conseguenza il rischio di contaminazione per l'uomo. Tuttavia gli stessi trattamenti di potabilizzazione che vengono effettuati prima della distribuzione sono generalmente efficaci per una sostanziale rimozione sia delle cellule sia delle cianotossine presenti.

Tra le cianotossine, le microcistine (MC) rappresentano le tossine più ampiamente distribuite e maggiormente implicate negli episodi di carattere sanitario riscontrati finora.

Le MC sono eptapeptidi monociclici a basso peso molecolare caratterizzati dalla presenza di un aminoacido idrofobico, l'ADDA (acido 3-ammino, 9-metossi, 2,6,8-trimetil, 10-fenildeca, 4,6-

dienico). I numerosi congeneri di MC, caratterizzati da proprietà tossicologiche notevolmente diverse, si differenziano fundamentalmente a livello di due amminoacidi sui quali è anche basata la nomenclatura delle MC.

Sebbene ad oggi siano stati identificati più di 80 congeneri di MC, la WHO ha stabilito una concentrazione limite provvisoria per le acque destinate al consumo umano solo per la MC-LR, il composto ritenuto più diffuso e tossico, i cui amminoacidi sostituenti sono rispettivamente leucina e arginina. Sulla base dei dati tossicologici disponibili (*Tolerable Daily Intake*, TDI di 0,04 µg/kg pc/giorno) la WHO ha fissato per la MC-LR un valore guida di 1,0 µg/L. In considerazione della scarsa attendibilità di un approccio indiretto per la sorveglianza delle cianotossine nel corpo idrico basato sul controllo di parametri quali nutrienti e/o densità di cianobatteri, numerosi Paesi anche all'interno dell'UE, prevedono il monitoraggio delle microcistine nelle acque, con un valore di parametro per la MC-LR basato sulle indicazioni della WHO.

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile per l'estrazione di microcistine (Dem-MC-RR, MC-RR, MC-YR, Dem-MC-LR, MC-LR, MC-LA, MC-LY, MC-LF, MC-LW) da acque da destinare e destinate al consumo umano, incluse le acque di sorgente, le acque di piscina e quelle utilizzate per la produzione di acque per dialisi, secondo le definizioni riportate nelle normative vigenti.

Gli analiti sono determinati mediante cromatografia liquida a fase inversa accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MSMS).

Il campo di applicazione è compreso nell'intervallo 0,01-10 µg/L. Il limite di rivelabilità è compreso nell'intervallo 0,002-0,025 µg/L.

2. Principio del metodo

Il campione d'acqua, del volume di 0,5 L, è sottoposto ad estrazione in fase solida (SPE) utilizzando come materiale adsorbente 0,5 g di CarbograpTM 4, un *Graphitized Carbon Black*, per la preconcentrazione degli analiti.

Come standard di processo è utilizzato la nodularina.

Gli analiti estratti sono successivamente separati, identificati e quantificati mediante un sistema LC-MSMS a triplo quadrupolo, equipaggiato con una interfaccia elettrospray a pressione atmosferica (ESI). La misura si basa sull'intensità dei segnali ionici relativi a due transizioni ione pseudo-molecolare > ione frammento degli analiti.

La determinazione di MC nei campioni di acqua prevede l'impiego di procedure di preparazione del campione differenti a seconda della componente di analiti da determinare, in particolare:

- estrazione e analisi della frazione totale di tossine. Questo tipo di estrazione prevede la lisi cellulare mediante cicli di congelamento-scongelo del campione (procedura estrattiva A) per liberare il contenuto intracellulare di tossine
- estrazione e analisi della frazione extracellulare o libera (procedura estrattiva B).

3. Prelievo e conservazione dei campioni

3.1. Bianco campione

Per “bianco campione” si intende un campione costituito dalla stessa matrice avente caratteristiche analoghe al campione oggetto di indagine.

I bianchi campione, che devono essere privi degli analiti, possono essere ottenuti utilizzando:

- acqua di rubinetto previa rimozione dei residui di agenti disinfettanti, in particolare il cloro, che agiscono come ossidanti nei confronti delle MC e dello standard di processo, abbattendone i contenuti; la rimozione del cloro residuo può essere ottenuta per trattamento con una soluzione di sodio tiosolfato (preparata disciogliendo 1 g di sodio tiosolfato in 100 mL di acqua deionizzata), aggiungendo 100 µL di tale soluzione di sodio tiosolfato per ogni litro di acqua da trattare;
- acque superficiali;
- acqua deionizzata.

I bianchi campione possono essere utilizzati:

- per verifica della specificità del metodo;
- per controlli di qualità;
- per preparazione di campioni contaminati artificialmente.

3.2. Raccolta dei campioni

Il prelievo dei campioni da sottoporre ad analisi deve essere eseguito utilizzando come contenitori bottiglie di polietilene o vetro scuro (4.1.1, A.4.1.14) lavate con acqua ultrapura (5.1.1) esente da tracce dell'analita.

Nel caso di prelievi da cisterne, pozzi o invasi, il campionamento deve essere eseguito prelevando un volume pari a 1 L ad una profondità compresa tra 0 e 1 m.

Campionamenti di acqua possono essere effettuati anche all'interno dei sistemi di distribuzione o da rubinetti di utenza; in questi casi è necessario tenere presente che i trattamenti delle acque (quali sedimentazioni, filtrazioni, flocculazioni e/o disinfezioni, in particolare la presenza di cloro libero residuo nelle acque distribuite) possono inficiare le prestazioni dello standard di processo.

3.3. Conservazione dei campioni

3.3.1. Analisi del contenuto totale di tossine

Conservare i campioni in bottiglie di polietilene o vetro (4.1.1, 4.1.14) e sottoporli ad almeno un ciclo di congelamento e scongelamento ($-18\pm 3^{\circ}\text{C}$) al fine di favorire la lisi.

3.3.2. Analisi del contenuto extracellulare di tossine

Conservare i campioni in bottiglie di polietilene o vetro (4.1.1, 4.1.14) al buio e alla temperatura di $1-10^{\circ}\text{C}$ per prevenire la degradazione degli analiti dovuta all'azione di luce e agenti microbiologici. In queste condizioni la conservazione è limitata ad un tempo massimo di 24 h.

4. Vetreria, materiali e attrezzature di base

4.1. Attrezzature di uso comune di laboratorio

- (4.1.1) Bottiglie in polietilene da 1 L resistenti al congelamento idonei anche per il trasferimento del campione al sistema di estrazione SPE (4.1.10);
- (4.1.2) Filtri a fascia nera;
- (4.1.3) Filtri di fibra di vetro del tipo Whatman™ MN-GF5 di diametro adeguato al sistema filtrante, diametro pori $\leq 0,45 \mu\text{m}$ o analoghi;
- (4.1.4) Matracci tarati in vetro di classe A di idoneo volume (0,01 L, 0,05 L, 0,1 L, 0,5 L, 1 L);
- (4.1.5) Microsiringhe in vetro;
- (4.1.6) Pipette in vetro tarate di classe A;
- (4.1.7) *Vial* in vetro con tappo a vite da 1,5 mL;
- (4.1.8) Bagno ad ultrasuoni;
- (4.1.9) Sistema di filtrazione in vetro o materiale plastico autoclavabile o monouso completo di pompa da vuoto;
- (4.1.10) Sistema per estrazione SPE, per estrazioni singole o multiple, completo di pompa da vuoto, sistema di regolazione del flusso manometri e accessori;
- (4.1.11) Sistema di evaporazione sotto flusso di argon o di azoto;
- (4.1.12) Cartucce per estrazioni SPE da 8 cc, contenenti 0,5 g di Carbograph 4;
- (4.1.13) Beuta in FEP-Teflon™ o in vetro da 1 L;
- (4.1.14) Bottiglie in vetro scuro da 1L;
- (4.1.15) Beuta in FEP- Teflon™ o in vetro da 50 mL;
- (4.1.16) Provette o *vial* per il recupero dell'eluato, preferibilmente in FEP-Teflon o in vetro, da 10-20 mL;
- (4.1.17) Agitatore magnetico;
- (4.1.18) *Vial* per la conservazione degli standard analitici, preferibilmente in FEP-Teflon o in vetro scuro, di idoneo volume;
- (4.1.19) Filtri per siringa in PTFE da 13 mm di diametro e $0,45 \mu\text{m}$ di porosità.

Tutta la vetreria e i contenitori, ad esclusione di quelli monouso, prima del loro impiego devono essere accuratamente lavati con detergenti per vetreria e risciacquati in sequenza con acqua di rubinetto, acqua Milli-Q esente da tracce da analiti (5.1.1), acetone (5.1.6) e metanolo (5.1.4).

5. Reagenti e materiali di riferimento

5.1. Reagenti e standard

Tutti i reagenti utilizzati sono di grado RS (per LC) o superiore e i materiali di riferimento al più elevato grado di purezza disponibile in commercio.

- (5.1.1) Acqua ultrapura (resistenza $\geq 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$, TOC $\geq 2 \text{ ng/L}$), esente da tracce di analita;
- (5.1.2) Acetonitrile;
- (5.1.3) Acido formico concentrato (46 M);
- (5.1.4) Metanolo;
- (5.1.5) Acido trifluoroacetico (TFA) concentrato, 13 M;
- (5.1.6) Acetone;

- (5.1.7) Diclorometano;
- (5.1.8) Acido cloridrico al 37%, grado tecnico;
- (5.1.9) Azoto o argon ultrapuro;
- (5.1.10) Standard di processo per microcistine: utilizzare nodularina 1 mg ALEXIS BIOCHEMICALS™ (La Jolla, CA, USA) o prodotto analogo;
- (5.1.11) Analiti: MC-LW 25 µg; MC-LF 25 µg; MC-LY 25 µg; MC-LA 100 µg; MC-YR 25 µg; MC-LR 500 µg; MC-RR 250 µg; ALEXIS BIOCHEMICALS™ (La Jolla, CA, USA) o prodotto analogo;
- (5.1.12) Analiti: dem-MC-RR 8 µg/mL, dem-MC-LR 7 µg/mL DHI (Horsholm, Denmark) o ALEXIS BIOCHEMICALS™ (La Jolla, CA, USA) o prodotto analogo;
- (5.1.13) Tiosolfato di sodio.

5.2. Soluzioni

Soluzioni di reagenti:

- (5.2.1.1) Miscela acqua:acetonitrile, 70:30 (v/v): prelevare 700 mL di acqua ultrapura (5.1.1) e 300 mL di acetonitrile (5.1.2), riunire in una beuta (4.1.13) e miscelare accuratamente;
- (5.2.1.2) Miscela diclorometano:metanolo, 80:20 (v/v) 10 mM TFA: prelevare 400 mL di diclorometano (5.1.7) e 100 mL di metanolo (5.1.4), riunire in una beuta (1.13), miscelare accuratamente e aggiungere 335 µL di TFA (5.1.5) con una microsiringa (4.1.5). Conservare la soluzione in frigorifero ad una temperatura di 5±3°C in bottiglie in vetro scuro (4.1.14) per evitare l'esposizione alla luce;
- (5.2.1.3) Soluzione acquosa 1M di acido formico: prelevare un volume di acido formico (5.1.3) pari a 1 mL tramite pipetta di vetro (4.1.6), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 50 mL (4.1.4) e portare a volume con acqua ultrapura (5.1.1);
- (5.2.1.4) Soluzione acquosa 1M di acido cloridrico: prelevare un volume di acido cloridrico (5.1.8) pari a 8 mL tramite idonea pipetta di vetro (4.1.6), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 100 mL (4.1.4) e portare a volume con acqua ultrapura (5.1.1);
- (5.2.1.5) Soluzione acquosa 0,01 M di acido cloridrico: prelevare un volume di soluzione acquosa 1 M di acido cloridrico (5.2.1.3) pari a 10 mL tramite idonea pipetta di vetro (4.1.6), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 1 L (4.1.4) e portare a volume con acqua ultrapura (5.1.1).

5.2.1. Soluzioni standard di lavoro

Per la preparazione di soluzioni primarie di standard devono essere utilizzati materiali certificati di cianotossine al più elevato grado di purezza disponibile in commercio.

Il reperimento di standard di microcistine è sottoposto a regolamentazione internazionale sulla commercializzazione di agenti biologici che costituiscono un rischio per l'operatore; tale regolamentazione prevede l'assunzione di responsabilità nell'acquisto e utilizzo e una dichiarazione di destinazione d'uso e comporta generalmente tempi di approvvigionamento dell'ordine di alcuni mesi.

- 5.2.2.1 Soluzione primaria dello standard di processo, Nodularina (250 µg/mL)
 - (5.2.2.1.1) Solubilizzare il materiale standard di Nodularina (5.1.10) in un *vial* (4.1.18) con un volume di Metanolo (5.1.4) pari a 4 mL prelevato con idonea pipetta (4.1.6), ottenendo una soluzione alla concentrazione di 250 µg/mL;
 - (5.2.2.1.2) Agitare la soluzione (5.2.2.1.1) per un arco di tempo pari a 15 minuti utilizzando un agitatore magnetico (4.1.17).

- Dopo la preparazione, la soluzione è conservata a $-18\pm 3^{\circ}\text{C}$ ed è stabile per almeno 3 mesi.
- 5.2.2.2 Soluzione primaria degli analiti
Solubilizzare il materiale standard (standard stock solution) di ciascun analita (5.1.11) in un *vial* (4.1.18) con un volume di metanolo (5.1.4) pari a quanto indicato in colonna B della Tabella A1 prelevato con idonea pipetta (4.1.6), ottenendo delle soluzioni a concentrazioni differenti secondo quanto riportato in colonna C. Il materiale standard degli analiti dem-MC-RR e dem-MC-LR (5.1.12) non richiede solubilizzazione con metanolo, in quanto viene fornito già in soluzione. Dopo la preparazione, le soluzioni sono conservate a $-18\pm 3^{\circ}\text{C}$ e risultano stabili per almeno 3 mesi.

Tabella 1. Composizione della soluzione primaria degli analiti

Microcistina	Volume di solubilizzazione mL	Concentrazione finale soluzione standard primaria (A.5.2.2.2), $\mu\text{g/mL}$
MC-RR	4	62
MC-LA	4	25
MC-LR	4	125
MC-YR	4	25
MC-LF	4	6
MC-LW	4	6
MC-LY	4	6
dem-MC-RR	-	8*
dem-MC-LR	-	7*

*concentrazione indicata dal produttore

- 5.2.2.3 Soluzione secondaria di lavoro di Nodularina ($5 \mu\text{g/mL}$)
Prelevare con idonea microsiringa (4.1.5) $200 \mu\text{L}$ della soluzione primaria di standard di processo (5.2.2.1), trasferire in un matraccio da 10 mL (A.4.1.4) e portare a volume con metanolo (5.1.4), ottenendo una soluzione alla concentrazione di $5 \mu\text{g/mL}$.
Dopo la preparazione la soluzione è conservata a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ed è stabile per almeno 3 mesi.
- 5.2.2.4 Soluzione secondaria di riferimento composita degli analiti ($1 \mu\text{g/mL}$)
Si preleva un'idonea aliquota da ogni soluzione primaria (5.2.2.2), secondo lo schema riportato in Tabella 2 tramite idonee microsiringhe (4.1.5). Si riuniscono le aliquote e si diluisce in opportuno volume di metanolo (5.1.4), per ottenere la soluzioni secondaria di riferimento composita a concentrazione opportuna (*working standard solution*).

Tabella 2. Composizione della soluzione di riferimento composita

Microcistina	Soluzione primaria (5.2.2.2)		Soluzione secondaria (5.2.2.4)	
	Concentrazione di riferimento $\mu\text{g/mL}$	Volume da prelevare μL	Volume finale mL	Concentrazione $\mu\text{g/mL}$
MC-RR	62	24	1,5	1
MC-LA	25	60	1,5	1
MC-LR	125	12	1,5	1
MC-YR	25	60	1,5	1
MC-LF	6	280	1,5	1
MC-LW	6	280	1,5	1
MC-LY	6	280	1,5	1
dem-MC-RR	8*	185	1,5	1
dem-MC-LR	7*	210	1,5	1

* concentrazione indicata dal produttore

6. Procedura estrattiva (SPE)

6.1. Preparazione del campione di prova per acque superficiali

6.1.1. Procedura estrattiva A per l'estrazione del contenuto totale (intracellulare + extracellulare) di tossine

- (6.1.1.1) Prelevare una aliquota di 0,5 L di campione (3.2);
- (6.1.1.2) Sottoporre il campione ad almeno un ciclo di congelamento e scongelamento al fine di favorire la lisi cellulare. È possibile eventualmente sonicare (4.1.8) il campione per ottenere il totale scongelamento;
- (6.1.1.3) Aggiungere lo standard di processo, Nodularina, alla concentrazione di 1 µg/L, prelevando con una microsiringa (4.1.5), 100 µL della soluzione secondaria di lavoro (5.2.2.3) pari a 500 ng dello standard di processo;
- (6.1.1.4) Se necessario, cioè laddove si valuti che la torbidità/presenza di particolato potrebbe occludere le colonnine per SPE durante l'estrazione, filtrare i campioni di acqua con filtri a fascia nera (4.1.2), utilizzando un sistema di filtrazione sotto vuoto (4.1.9) altrimenti procedere al punto (6.1.1.5);
- (6.1.1.5) Raccogliere il filtrato in un recipiente idoneo per l'estrazione SPE (4.1.1).
- (6.1.1.6) In presenza di un evidente residuo di filtrazione, lavare il particolato trattenuto dal filtro con 10 mL di metanolo (5.1.4) al fine di rimuovere eventuali analiti trattenuti in esso. La miscela è trasferita nel campione;
- (6.1.1.7) Lavare una cartuccia (4.1.12) per estrazione SPE in successione con due volumi (circa 12 mL) di diclorometano/metanolo (80:20, v/v) 10 mM TFA (5.2.1.2) e un volume (circa 6 mL) di metanolo (5.1.4);
- (6.1.1.8) Attivare la cartuccia con due volumi (circa 12 mL) di una soluzione acquosa 0,01 M HCl (5.2.1.5) ed eliminare il residuo con un volume (circa 6 mL) di acqua MQ (5.1.1);
- (6.1.1.9) Far passare il campione (3.2) attraverso la cartuccia ad un flusso non superiore a 10 mL/min, scartando il percolato;
- (6.1.1.10) Lavare la cartuccia con 6 mL di acqua ultrapura (5.1.1) sempre con un flusso non superiore a 10 mL/min;
- (6.1.1.11) Asciugare completamente la cartuccia SPE dall'acqua, tramite l'ausilio di una pompa da vuoto (4.1.10). Far passare 0,5 mL di metanolo (5.1.4) per eliminare ogni residuo di acqua con l'ausilio di una sistema da vuoto (4.1.10);
- (6.1.1.12) Eluire lentamente (a goccia a goccia) gli analiti trattenuti dalla fase stazionaria in successione con 1 mL di metanolo (5.1.4) e 6 mL di miscela di diclorometano /metanolo (80:20, v/v) acidificata con 10 mmol/L di TFA (5.2.1.2) in una provetta o *vial* da 10 mL (4.1.16);
- (6.1.1.13) Evaporare l'eluato (6.1.1.12) sotto moderato flusso di gas inerte azoto o argon (5.1.9) rimuovendo totalmente la fase liquida;
- (6.1.1.14) Riprendere il residuo (6.1.1.13) con 1 mL di miscela acqua-acetonitrile 70:30 (5.2.1.1);
- (6.1.1.15) Qualora la soluzione si presenti torbida, filtrare con filtri in PTFE (4.1.19);
- (6.1.1.16) Prelevare una aliquota dell'estratto ricostituito (6.1.1.14) con microsiringa (4.1.5) e sottoporre ad esame mediante LC-MSMS.

6.1.2. Procedura estrattiva B per l'estrazione della frazione di tossine extracellulari o libere

- (6.1.2.1) Prelevare una aliquota di 0,5 L di campione conservato secondo quanto indicato al punto (3.2);
- (6.1.2.2) Aggiungere al campione (6.1.2.1) lo standard di processo, Nodularina, alla concentrazione di 1 µg/L, prelevando con una microsiringa (4.1.5), 100 µL della soluzione secondaria di lavoro (5.2.2.3) pari a 500 ng dello standard di processo;
- (6.1.2.3) Filtrare i campioni di acqua utilizzando un sistema di filtrazione sotto vuoto (4.1.9) con filtri in fibra di vetro (4.1.3);
- (6.1.2.4) Raccogliere il filtrato in un recipiente idoneo per l'estrazione SPE (4.1.1);
- (6.1.2.5) Procedere con l'estrazione come descritto in precedenza nella procedura estrattiva A (6.1.1.6-6.1.1.16).

6.2. Preparazione del campione di prova per acque sottoposte a trattamento di potabilizzazione

6.2.1. Procedura estrattiva A per l'estrazione del contenuto totale (intracellulare + extracellulare) di tossine

- (6.2.1.1) Prelevare una aliquota di 0,5 L di campione (3.2);
- (6.2.1.2) Sottoporre il campione ad almeno un ciclo di congelamento e scongelamento al fine di favorire la lisi cellulare. È possibile eventualmente sonicare (4.1.8) il campione per ottenere il totale scongelamento;
- (6.2.1.3) In caso di presenza di cloro libero in concentrazione superiore a 0,5 mg/L, aggiungere tiosolfato di sodio in concentrazione pari a circa 18 mg/L (5.1.13);
- (6.2.1.4) Procedere con l'estrazione come descritto in precedenza nella procedura estrattiva A (6.1.1.3-6.1.1.16).

6.2.2. Procedura estrattiva B per l'estrazione della frazione di tossine extracellulari o libere

- (6.2.2.1) Prelevare una aliquota di 0,5 L di campione conservato secondo quanto indicati al punto (3.2);
- (6.2.2.2) In caso di presenza di cloro libero in concentrazione superiore a 0,5 mg/L, aggiungere tiosolfato di sodio in concentrazione pari a circa 18 mg/L (5.1.13);
- (6.2.2.3) Procedere con l'estrazione come descritto in precedenza nella procedura estrattiva A (6.1.2.2-6.1.2.5).

6.3. Preparazione del bianco campione

- (6.3.1) Trasferire 0,5 L di campione di acqua ultrapura in recipiente idoneo per l'estrazione SPE (4.1.1);
- (6.3.2) Procedere secondo quanto descritto ai punti 6.1.1.7-6.1.1.16.

6.4. Preparazione dei campioni per la curva di taratura

- (6.4.1) Predisporre un numero di recipienti idonei per l'estrazione SPE (4.1.1, 4.1.4) pari ai livelli di taratura considerati e, in ciascun recipiente, trasferire 0,5 L di bianco campione (6.3);
- (6.4.2) Aggiungere a ciascun bianco campione (6.3) con una microsiringa (4.1.5) o una pipetta (4.1.6), un volume di soluzione secondaria di riferimento composita (5.2.2.4), secondo lo schema riportato in Tabella 3 tale da ottenere il livello di concentrazione prefissato per ogni livello di taratura. Ad esempio, per una taratura a 5 livelli possono essere prestabiliti campioni per la taratura aventi concentrazioni teoriche pari a 0,1 µg/L, 1 µg/L, 2,5 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L prelevando un volume di soluzione secondaria di riferimento composita (5.2.2.4) pari al valore riportato in colonna C;
- (6.4.3) Procedere secondo quanto descritto ai punti 6.1.1.7-6.1.1.16.

Tabella 3. Composizione dei campioni per la curva di taratura

Livello di taratura	Concentrazione corrispondente nel campione* (µg/L)	Prelievo da soluzione secondaria di riferimento composita (5.2.2.4) (mL)
1	0,1	0,05
2	1,0	0,50
3	2,5	1,25
4	5,0	2,50
5	10,0	5,00

* valore teorico ottenuto per calcolo sulla base della procedura estrattiva adottata nel metodo

7. Analisi LC-MSMS

7.1. Strumentazione analitica e accessori

Cromatografo liquido accoppiato allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo (LC-MSMS), eventualmente preceduto da sistema automatico di iniezione (autocampionatore), costituito in sequenza da:

- (7.1.1) Pompa HPLC adatta a gestire microflussi ed eluizione in gradiente binaria equipaggiata di sistema di iniezione a valvola, utilizzando microsiringhe con loop interno da almeno 50 µL;
- (7.1.2) Compartimento di termostatazione per la colonna;
- (7.1.3) Colonna a fase inversa C-18 (150 x 2,1 mm I.D. 5 µm) o analoghe;
- (7.1.4) Analizzatore di massa a triplo quadrupolo equipaggiato con sorgente ESI a pressione atmosferica del tipo TIS (*Turbo Ion Spray*) o analogo; il sistema TIS-MSMS è fatto operare in modalità positiva, utilizzando aria come gas di nebulizzazione, di desolvatazione e nella cella di collisione e azoto come curtain gas. L'utilizzo di sorgenti di differenti tipologie può comportare la necessità di un processo di ottimizzazione dei parametri fisici e strumentali;
- (7.1.5) Sistema di acquisizione ed elaborazioni dati.

7.2. Fasi mobili

Le separazioni LC-MSMS sono realizzate in gradiente binario utilizzando come fasi mobili le seguenti soluzioni:

- (7.2.1) Soluzione di acido formico 10 mM in acqua ultrapura: prelevare un volume di soluzione acquosa 1 M di acido formico (5.2.1.3) pari a 10 mL tramite idonea pipetta di vetro (4.1.6), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 1 L (4.1.4) e portare a volume con acqua ultrapura (5.1.1);
- (7.2.2) Soluzione di acido formico 10 mM in acetonitrile: prelevare un volume di soluzione acquosa 1 M di acido formico (5.2.1.3) pari a 10 mL tramite idonea pipetta di vetro (4.1.6), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 1 L (4.1.4) e portare a volume con acetonitrile (5.1.2).

7.3. Determinazione LC-MS su campioni di prova

7.3.1. Operazioni preliminari

Attivare l'apparecchiatura e predisporla al funzionamento secondo le procedure operative specifiche o le indicazioni fornite dai manuali d'uso. In particolare:

- ottimizzare i parametri funzionali dello spettrometro di massa e assicurare la corretta calibrazione delle masse;
- assicurarsi che lo strumento raggiunga l'equilibrio e scegliere un fondo scala compatibile con la concentrazione degli ioni da determinare.

7.3.2. Condizioni operative preliminari

Per le determinazioni in LC-MSMS predisporre la valvola di iniezione, o in alternativa, un autocampionatore in modo da iniettare nel sistema un volume fisso pari a 50 μ L dell'estratto concentrato e impostare le condizioni strumentali idonee allo scopo riportate, a titolo di esempio, in Tabella 4.

Tabella 4. Esempio di condizioni strumentali (mass-spettrometriche e cromatografiche)

Analita	Condizioni MS**					
	MRM (m/z)*	DP	FP	EP	CXP	CE
MC-RR	520>135,5	60	400	10	8	40
	520>127	60	400	10	8	60
MC-LR	995,5>135,5	60	400	10	8	100
	995,5>137,5	60	400	10	8	125
MC-LA	910,5>135,5	55	400	10	9	80
	910,5>776,5	55	400	10	21	25
MC-YR	1045,5>135,5	60	400	10	9	100
	1045,5>213,5	60	400	10	15	84
MC-LF	986,5>478,5	60	400	10	13	30
	986,5>852,5	60	400	10	13	30
MC-LW	1025,5>446,5	30	400	10	13	30
	1025,5>891	30	400	10	13	30
MC-LY	1002,5>135,5	40	400	10	13	90
	1002,5>868	40	400	10	13	30
Dem-MC-RR	513>135,5	60	400	10	8	42
	135,5>127,5	60	400	10	8	60
Dem-MC-LR	981,5>135,5	60	400	10	8	95
	981,5>70	60	400	10	8	125
Nodularina (standard di processo)	825>135,5	60	400	10	8	80

* Transizione ione precursore > ione frammento; ** Condizioni del TIS: voltaggio 5500 V; Curtain gas flow 10 u.a.; Nebulizer gas flow 12 u.a.; Turbo-gas flow 30 u.a.; CAD flow 6 u.a.

MRM: Multiple Reaction Monitoring; **DP:** Declustering Potential; **FP:** Focusing Potential; **EP:** Entrance Potential; **CXP:** potenziale di uscita dalla cella di collisione; **CE:** Collision Energy; **u.a.:** unità arbitrarie

Condizioni LC		
LC	Colonna:	a fase inversa C-18 (150 x 2,1 mm I.D. 5 µm) Altima (Alltech) o analoga.
	Fase mobile:	fase A: acetone nitrile 10 mM acido formico; fase B: acqua 10 mM acido formico.
	Gradiente (t in min):	t ₀ →A= 35 %; t ₁₅ →A= 70 %; t ₁₆ →A= 100%; t ₂₀ →A= 35%; t ₂₉ →A=35%.
	Temperatura colonna:	40°C

7.3.3. Costruzione della curva di taratura

- (7.3.3.1) Analizzare i diversi campioni di taratura (6.4), iniettando una aliquota da 50 µL di ciascuna soluzione (6.1.1.16) per ciascun livello di taratura prefissato;
- (7.3.3.2) Analizzare mediante LC-MSMS, e tabulare il valore del rapporto tra l'area prodotta dalla somma dei segnali relativi alle due transizioni ione precursore>ione prodotto selezionate per ciascun analita e l'area prodotta dal segnale relativo alla transizione ione precursore>ione prodotto per lo standard di processo (A_{analita}/A_{standard di processo}) in corrispondenza di ogni livello di concentrazione per ciascun analita;
- (7.3.3.3) Con l'ausilio di un programma dedicato (o di idonee espressioni matematiche) determinare con il metodo dei minimi quadrati, per l'intervallo lineare della curva individuato per es. con il metodo dei residui, l'equazione della retta di taratura $Y = a \cdot X + b$ dove $Y = A_{analita} / A_{standard di processo}$, $X =$ concentrazione di ciascun analita espressa in µg/L, $a =$ coefficiente angolare a valore noto, $b =$ intercetta sull'asse delle Y, a valore noto. Data la variabilità conseguente alla dipendenza dalle condizioni cromatografiche verificare periodicamente la validità dell'equazione corrispondente alla retta di taratura, ricavata con il metodo dei minimi quadrati, processando e analizzando due suoi punti;
- (7.3.3.4) Il coefficiente di correlazione "r²", nell'intervallo lineare della curva di taratura, deve essere $\geq 0,98$;
- (7.3.3.5) Memorizzare i dati di taratura nel metodo cromatografico residente sul sistema di gestione (7.1.5).

7.3.4. Controllo del bianco

Controllare una aliquota di bianco campione non addizionato dallo standard di processo sottoponendola alla stessa procedura analitica prevista per il campione, allo scopo di individuare gli eventuali interferenti presenti nel tracciato cromatografico nell'intorno del tempo di ritenzione degli analiti da ricercare.

7.3.5. Identificazione dell'analita

L'identificazione degli analiti deve basarsi sul tempo di ritenzione e sui segnali ionici relativi alle transizioni ione precursore>ione frammento. I dati sull'identificazione degli analiti devono essere ottenuti per confronto in identiche condizioni sperimentali tra il tempo di ritenzione cromatografico relativo per la/le transizione/i diagnostica/che riferite al campione in esame e il tempo di ritenzione cromatografico relativo per la/le transizione/i diagnostica/che riferite all'ultima soluzione di riferimento/curva di taratura

Per acquisizioni in MRM (Multiple Reaction Monitoring), dovranno essere anche osservati i rapporti tra le transizioni diagnostiche. In Figura 1 è riportato un cromatogramma rappresentativo ottenuto dall'analisi LC-MSMS di un campione bianco e addizionato di una miscela delle microcistine selezionate e dello standard di processo, la nodularina.

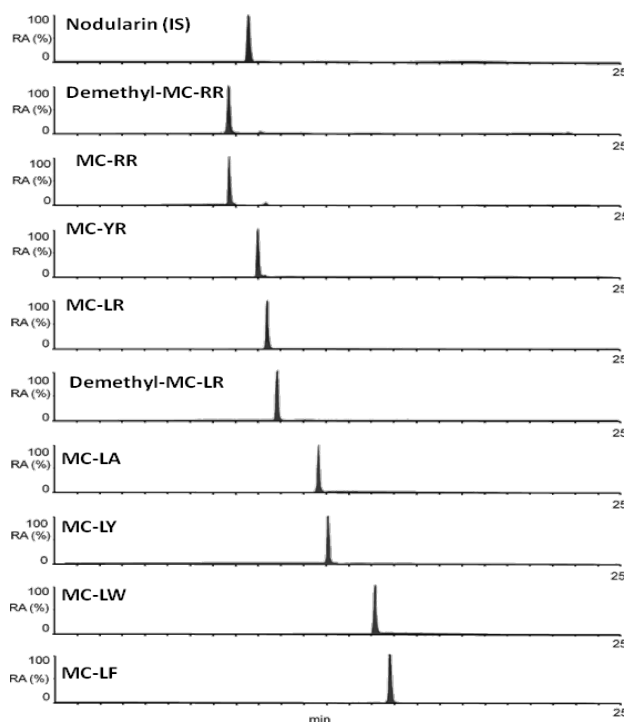


Figura 1. Cromatogramma rappresentativo risultante da un'iniezione di 0,5 L di un campione bianco contaminato con 0,1 µg/L di una miscela delle microcistine selezionate e 1 µg/L dello standard di processo, determinato tramite LC-MSMS in modalità MRM

7.3.6. Analisi quantitativa in LC-MS

- (7.3.6.1) Analizzare ciascuna aliquota di estratto oggetto di indagine (6.1; 6.2, 6.3; 6.4);
- (7.3.6.2) Dedurre il valore incognito della concentrazione X di ciascun analita nel campione di prova mediante un programma dedicato oppure sostituendo nella equazione della retta di taratura (7.3.3.3) il valore della Y ottenuto sperimentalmente per il campione processato;
- (7.3.6.3) Il valore della Y nel campione di prova deve sempre cadere all'interno dell'intervallo di linearità o riportato in esso per opportuna diluizione del campione;
- (7.3.6.4) microgrammi per litro (µg/L), vengono riportati con una cifra significativa per concentrazioni ≥ 100 µg/L, con due cifre significative per concentrazioni comprese tra 1-100 µg/L e con tre cifre significative per concentrazioni < 1 µg/L.

8. Prestazioni del metodo

Le caratteristiche di prestazione del metodo ottenute mediante prove intra-laboratorio indicano, nell'intervallo del campo di applicazione di 0,01-10 µg/L, valori di esattezza, espressa come recupero percentuale, superiori allo 85% e una precisione, intesa come riproducibilità intra-laboratorio ed espressa come deviazione standard relativa, inferiore al 25% per tutti gli analiti oggetto di indagine. Il limite di rivelabilità è compreso nell'intervallo 0,002-0,025 µg/L.

METODO DI SCREENING MULTIELEMENTARE ICP-MS: ANALISI SEMIQUANTITATIVA

0. Generalità e campo di applicazione

Il metodo è funzionale ad analisi di screening multi-elementari semiquantitative e particolarmente in applicazioni per indagini esplorative nell'ambito del Piano di sicurezza dell'acqua, come analisi di primo livello, accoppiato a una eventuale successiva analisi di conferma quantitativa su elementi di interesse. In Figura 1 sono riportati una serie (non esaustiva) di elementi potenzialmente determinabili con il metodo di screening proposto.

1 1.008 H																	2 4.0026 He
3 6.94 Li	4 9.0122 Be											5 10.81 B	6 12.011 C	7 14.007 N	8 15.999 O	9 18.998 F	10 20.180 Ne
11 22.990 Na	12 24.305 Mg											13 26.982 Al	14 28.085 Si	15 30.974 P	16 32.06 S	17 35.45 Cl	18 39.948 Ar
19 39.098 K	20 40.078 Ca	21 44.956 Sc	22 47.867 Ti	23 50.942 V	24 51.996 Cr	25 54.938 Mn	26 55.845 Fe	27 58.933 Co	28 58.693 Ni	29 63.546 Cu	30 65.38 Zn	31 69.723 Ga	32 72.64 Ge	33 74.922 As	34 78.971 Se	35 79.904 Br	36 83.798 Kr
37 85.468 Rb	38 87.62 Sr	39 88.906 Y	40 91.224 Zr	41 92.906 Nb	42 95.95 Mo	43 (98) Tc	44 101.07 Ru	45 102.91 Rh	46 106.42 Pd	47 107.87 Ag	48 112.41 Cd	49 114.82 In	50 118.71 Sn	51 121.76 Sb	52 127.60 Te	53 126.90 I	54 131.29 Xe
55 132.91 Cs	56 137.33 Ba	57-71 La-Lu	72 178.49 Hf	73 180.95 Ta	74 183.84 W	75 186.21 Re	76 190.23 Os	77 192.22 Ir	78 195.08 Pt	79 196.97 Au	80 200.59 Hg	81 204.38 Tl	82 207.2 Pb	83 208.98 Bi	84 (209) Po	85 (210) At	86 (222) Rn
87 (223) Fr	88 (226) Ra	89-103 Ac-Lr	104 (267) Rf	105 (268) Db	106 (271) Sg	107 (272) Bh	108 (277) Hs	109 (278) Mt	110 (281) Ds	111 (280) Rg	112 (285) Cn	113 (...) Uut	114 (287) Fl	115 (...) Uup	116 (291) Lv	117 (...) Uus	118 (...) Uuo
			57 138.91 La	58 140.12 Ce	59 140.91 Pr	60 144.24 Nd	61 (145) Pm	62 150.36 Sm	63 151.96 Eu	64 157.25 Gd	65 158.93 Tb	66 162.50 Dy	67 164.93 Ho	68 167.26 Er	69 168.93 Tm	70 173.05 Yb	71 174.97 Lu
			89 (227) Ac	90 232.04 Th	91 231.04 Pa	92 238.03 U	93 (237) Np	94 (244) Pu	95 (243) Am	96 (247) Cm	97 (247) Bk	98 (251) Cf	99 (252) Es	100 (257) Fm	101 (258) Md	102 (259) No	103 (262) Lr

Figura 1. Tavola periodica degli elementi con in evidenza gli elementi potenzialmente rivelabili con il presente metodo

1. Apparecchiature

Spettrometro ICP-MS tipo Perkin Elmer NexIon™ 300D o altro strumento di prestazioni equivalenti.

2. Reagenti e materiali di riferimento

In generale tutti i reagenti devono essere di grado analitico e con caratteristiche adatte all'analisi attraverso ICP-MS.

Tutti i materiali di riferimento devono avere purezza o concentrazione certificate.

- (2.1) Acqua ultrapura;
- (2.2) Soluzione primaria Ir 1000 mg/L;
- (2.3) Soluzione intermedia Ir 50 mg/L;
- (2.4) Soluzione finale Ir 50 µg/L;
- (2.5) Soluzione multielemento (Be, Ce, Fe, In, Li, Mg, Pb, U 1 µg/L HNO₃ 1%);
- (2.6) Soluzione multielemento (Al, Ba, Ce, Cu, In, Co, Li, Mg, Mn, Ni, Pb, Tb, U, Zn 200 µg/L HNO₃ 2%);
- (2.7) Acido nitrico fumante (d=1,51 g/mL).

3. Attrezzatura di laboratorio

Tutta la vetreria e i contenitori, ad esclusione di quelli monouso, dovranno essere preventivamente trattati allo scopo di rimuovere eventuali tracce dell'analita e dei possibili interferenti. Al fine di evitare operazioni di pulizia che possono risultare non completamente efficienti, si sconsiglia l'uso di attrezzatura precedentemente impiegata per il trattamento e la conservazione di matrici particolarmente complesse (acque reflue, fanghi, suoli, alimenti, ecc.). Il materiale utilizzato per la prima volta deve essere preventivamente sgrassato con tensioattivo esente da fosfati, abbondantemente risciacquato con acqua di rubinetto, e infine risciacquato con acqua (1.1) Il materiale già utilizzato, per l'analisi di questi analiti, deve essere risciacquato con acqua (1.1).

4. Procedura analitica

4.1. Preparazione campioni e soluzioni di lavoro:

- Campioni: Il campione di acqua, conservato in una falcon da 50 mL in polipropilene, viene acidificato tramite aggiunta di 331 µL di (1.7) in 50 mL di volume totale (aggiungere standard interno Ir 50 ppb qualora lo strumento non fosse dotato di sistema di introduzione automatica dello standard interno)
- Bianco: acidificare tramite aggiunta di 331 µL di (1.7) in 50 mL di volume finale di acqua ultrapura
- Soluzione (1.3): prelevare 2,5 mL di soluzione 1.2 e portando al volume finale di 50 mL previa acidificazione con 331 µL di (1.7).
- Soluzione (1.4): prelevare 125 µL di (1.3) e portare a volume finale di 125 mL previa acidificazione con 828 µL di (1.7)
- Le soluzioni multielemento (1.5) e (1.6) si preparano a partire da soluzioni standard elementari per ICP-MS a 1000 mg/L.

4.2. Condizioni strumentali

- Sistema di introduzione del campione: autocampionatore, Nebulizzatore di Meinhard con Camera di nebulizzazione ciclonica
- Modalità standard: eliminazione delle interferenze isobariche mediante equazioni di correzione
- Analizzatore: modalità doppia (analogica/digitale) simultanea

Prima di procedere con l'analisi verificare l'effettiva funzionalità della strumentazione procedendo all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo l'ordine:

1. allineamento della torcia ICP
2. flusso del gas nebulizzatore
3. *autolens*: ottimizzazione del voltaggio delle lenti di focalizzazione del fascio ionico
4. *dual detector*: ottimizzazione della funzionalità dell'analizzatore analogico e digitale (ove disponibile)
5. *daily performance check*: verifica della rispondenza dello strumento alle specifiche costruttive attraverso l'analisi di una soluzione standard di controllo ("daily solution")

Per i punti 1, 2, 3, e 5 viene impiegata la Soluzione 1.5 mentre per il punto 4 la Soluzione 1.6.

Dopo l'ottimizzazione delle condizioni operative si può procedere con l'analisi semiquantitativa attraverso l'interfaccia del software secondo le specifiche del produttore.

4.3. Composizione del batch analitico

- 1 bianco HNO₃ 1%
- Max 5 campioni
- 1 soluzione di verifica a titolo noto (Soluzione 1.6)
- 1 bianco HNO₃ 1%

4.4. Specifiche tecniche del metodo di acquisizione

Parametri per il controllo dell'acquisizione dati

Azione	N. di esecuzione
Sweeps/Reading	20
Readings/Replicate	1
Replicates	3

Range di masse atomiche osservate durante ciascuna misura

Massa minore	Massa maggiore
6	15
19	39
42	210
230	240

Parametri per la gestione del campionamento e della pompa peristaltica

Azione	Time (sec)	Speed (+/- rpm)
Sample flush	90	-24
Read delay	15	-20
Wash	45	-48

5. Calcolo ed espressione del risultato

Il software di gestione del sistema generalmente esprime automaticamente il risultato come rapporto tra il valore dell'area del picco dell'analita moltiplicato per il valore di concentrazione dello standard interno (50 ppb) e il valore dell'area del picco dello standard interno. In mancanza di tale automazione è possibile procedere all'integrazione e al calcolo manuale sempre secondo la medesima proporzione.

6. Prestazioni del metodo

Trattandosi di un metodo di un metodo semiquantitativo strumentale, le caratteristiche di performance possono essere fortemente influenzate dalla tipologia di strumento in uso e dalle specifiche tecniche

Bibliografia

- Chen H, Dabek-Zlotorzynska E, Rasmussen PE, Hassan N, Lanouette M. Evaluation of semiquantitative analysis mode in ICP-MS. *Talanta* 2008;74:1547-55.
- PerkinElmer (Ed.). *The 30-Minute Guide to ICP-MS. Technical Note*. Waltham, MA: PerkinElmer Inc.; 2001.
- Soldevila J, El Himri M, Pastor A, De la Guardia M. (1998) Evaluation of operational parameters affecting semiquantitative multi-elemental analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1998;13:803-7.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di maggio 2019, 2° Suppl.*

*Stampato in proprio
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, luglio 2019