



Perfluorinated
compounds
Holistic
Environmental
Interinstitutional
eXperience



WITH THE CONTRIBUTION OF THE LIFE FINANCIAL
INSTRUMENT OF THE EUROPEAN COMMUNITY
LIFE16ENV/IT/000488-LIFE PHOENIX

Standard Operating Procedures (SOPs) for the analytical determination and quantification of PFAS in environmental matrices

[Deliverable n.1 of the Action C.1]

Project reference	LIFE16 ENV/IT/000488			
Project acronym	LIFE PHOENIX			
Project full title	Perfluorinated	compounds	HOlistic	ENvironmental Interinstitutional eXperience
Action C.1:	Environmental Monitoring			
Due date of deliverable	30/09/2018			
Lead beneficiaries	ARPAV, CNR-IRSA			
Authors	Roberto Lava, Caterina Cecchinato, Massimiliano Prenzato, Fabio Biancato, Francesca Zanon e Michele Gerotto (ARPAV) Claudia Ferrario, Sara Valsecchi e Stefano Polesello (CNR-IRSA)			

Dissemination Level

PU	Public	
CO	Confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)	X
CI	Classified, as referred to in Commission Decision 2001/844/EC	



UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI PADOVA



Contents

Summary	5
Sommario (in italian)	6
1 Actions taken by ARPAV	7
1.1 Standard Operating Procedure for the analysis of natural water	8
1.2 Standard Operating Procedure for the analysis of wastewater	8
1.3 Standard Operating Procedure for the analysis of soil	9
2 Actions taken by CNR-IRSA	11
2.1 Standard Operating Procedure for the analysis of vegetable and animal organisms	11
3 Conclusions	12

Annexes

ANNEX I: Validation Report of SOP for the analysis of natural water

ANNEX II: SOP for the analysis of natural water

ANNEX III: Validation Report of SOP for the analysis of wastewater

ANNEX IV: SOP for the analysis of wastewater

ANNEX V: SOP for the analysis of soil

ANNEX VI: Procedure for the analysis of vegetable and animal organisms

C.1 - Standard Operating Procedures (SOPs) for the analytical determination and quantification of PFAS in environmental matrices

Summary

The document summarizes the actions taken to make available Standard Operating Procedures (SOPs) for the analytical determination and quantification of PerFluoro Alkyl Substances (PFAS) in the different environmental matrices involved in the Project PHOENIX LIFE 16 ENV/ES/000488. The SOPs, one of the deliverables of monitoring Action C.1, are considered the necessary documents to produce efficiently results in support of the project. According to the timeline, the procedure should be developed and fully available by September 2018.

The partners involved are *Agenzia Regionale per la Prevenzione e la Protezione Ambientale del Veneto* (ARPAV) and *Consiglio Nazionale delle Ricerche – Istituto di Ricerca Sulle Acque* (CNR-IRSA) with their respective laboratories. The specific environmental matrices considered in PHOENIX Project are: water, soil, vegetable and animal organisms.

In details, to study the effectiveness of the technological tools (forecast and of mitigation) adopted in the operative Actions B.3 and B.4, reliable analytical methods are needed to determine the quantity of PFAS, the specific class of Persistent Mobile Organic Compounds (PMOC) considered as case study in PHOENIX Project. General analytical methods on PFAS are already available, known in literature and partially already in use in the laboratories of ARPAV and CNR-IRSA. However, for the purposes of PHOENIX Project, it is necessary to adapt the protocols to the aims of the Project, hence obtaining *fit-for-purpose* procedures for the specific emerging contaminants involved and for the environmental matrices selected.

ARPAV and CNR-IRSA has improved and refined the methods for PFAS available in literature in all kind of waters, in sediment and different soils, and in vegetable/animal tissues. In general, methods for the analysis of PFAS include an extraction step from the matrix, eventually a cleanup step on reverse phase according to the complexity of the same matrix and the final analysis and quantification with liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS) technique. The results obtained are shared with the other partners through the common platforms provided by the Project.

This document explains briefly the development of each analytical procedure obtaining as final outcome a specific detailed SOP.

Sommario (in italian)

Il documento sintetizza le azioni intraprese per rendere disponibili le Procedure di Prova (PdP) per la determinazione analitica e quantificazione delle Sostanze PerFluoroAlchiliche (PFAS) nelle diverse matrici ambientali coinvolte nel Progetto PHOENIX LIFE 16 ENV/ES/000488. Le PdP, uno dei *deliverables* dell'Azione di monitoraggio C.1, sono considerate documentazione necessaria per produrre in modo efficiente dei risultati a supporto del progetto stesso. Secondo l'agenda, le procedure devono essere sviluppate e disponibili per Settembre 2018.

I partner coinvolti sono l'*Agenzia Regionale per la Prevenzione e la Protezione Ambientale del Veneto* (ARPAV) e il *Consiglio Nazionale delle Ricerche – Istituto di Ricerca Sulle Acque* (CNR-IRSA) con i loro corrispettivi laboratori. Le matrici ambientali specifiche considerate del Progetto PHOENIX sono: acqua, suolo, organismi vegetali e organismi animali.

In dettaglio, per studiare l'efficacia degli strumenti tecnologici (previsionali e di mitigazione) adottati nelle azioni operative B.3 e B.4, sono necessari dei metodi analitici per determinare i PFAS, la classe specifica di composti organici persistenti che però presentano una certa mobilità in acqua (PMOC) considerata come caso studio nel Progetto PHOENIX. Le metodiche analitiche generali per la determinazione dei PFAS sono già disponibili, conosciute in letteratura e già parzialmente in uso nei laboratori ARPAV e CNR-IRSA. Tuttavia, per raggiungere gli obiettivi propri del Progetto PHOENIX, è necessario adattare i protocolli agli specifici scopi del progetto stesso, quindi ottenere metodi appropriati per contaminanti emergenti coinvolti e per le matrici selezionate.

ARPAV e CNR-IRSA hanno implementato e perfezionato le metodiche analitiche per i PFAS disponibili in letteratura per tutte le tipologie di acque, per sedimenti e differenti tipi di terreni, e per tessuti di origine animale e vegetale. In generale, i metodi per l'analisi dei PFAS prevedono una fase di estrazione dalla matrice, una eventuale fase di purificazione su fase inversa a seconda della complessità della matrice stessa e l'analisi quantitativa finale con tecnica di cromatografia liquida accoppiata con la spettrometria di massa (LC-MS). I risultati così ottenuti vengono condivisi con gli altri partner attraverso le piattaforme di condivisione previste dal Progetto.

Questo documento espone brevemente le operazioni intraprese per lo sviluppo di ogni procedura analitica ottenendo come prodotto finale una specifica PdP.

1 Actions taken by ARPAV

The role of ARPAV according to the specific objectives of the action *Environmental Monitoring*, is mainly to support the other operating actions with analytical activities on PFAS (sub-action C.1.2). ARPAV's activity is concentrated on the analysis of the matrices water and soil. Therefore, a proper *fit-for-purpose* analytical method need to be developed and validate (sub-action C.1.1).

When the project started, in September 2017, ARPAV had already an in-house validated method for the analysis of long-chain PFAS in water, according to its institutional mission and mandate. However, LIFE PHOENIX requires the development of specific protocols, including the short-chain PFAS.

Since ARPAV has its quality system in compliance with the standard ISO 9001:2015, as well needs to meet the requirements of the standard EN ISO/IEC 17025:2005 *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories* standard as Testing Laboratory, its SOPs should adopt specific requisites. The accreditation certifies the technical competence of the laboratory limited to the specific scopes. The accreditation body in charge for Italy is ACCREDIA. Hence, after the proper development, the analytical procedure needs to meet the detailed criteria identified by EN ISO/IEC 17025:2005; and then eventually proposed in a second moment to accreditation. According to the internal quality system, the validation of a SOP requires a supplementary document called *Validation Report*. This document is divided in two sections: the *Project of Validation* and the *Final Report*.

The *Project of Validation*, filled-in before the tests, is the planning document that explains the aim of the procedure and the parameters that will be developed to obtain the definitive SOP, including personnel involved, materials and a work schedule. In details, the *Project of Validation* contain the following sub-paragraphs:

- 1 – Identification of the procedure to validate
- 2 – Identification of the reference method (official, standard, from scientific literature, internal,...)
- 3 – Specific parameters to test and validate
- 4 – Matrices where the procedure is applicable
- 5 – Planning of the test including timing
- 6 – Personnel involved in the execution of the tests
- 7 – Materials, consumables and instrumentation in use

The *Final Report* shows the results of the validation tests, the reference methodology for the estimation of the uncertainty of the measure including the results, the effective quantification of human resources and materials involved and the final eligibility definition.

The output of this planning document, then, is a SOP approved by the lab responsible and the QA/QC manager. The finalized SOP is eventually proposed for accreditation at ACCREDIA.

C.1 - Standard Operating Procedures (SOPs) for the analytical determination and quantification of PFAS in environmental matrices

1.1 Standard Operating Procedure for the analysis of natural water

The method allows to determine the concentration of nine perfluoroalkylcarboxylic acids (from 4 to 12 carbon chain skeleton) and three perfluorosulfonic acids (4, 6 and 8 carbon chain skeleton) in samples of water relatively “clean” (surface water, groundwater, drinking water, mineral water, rainwater and brackish water). This specific procedure was already in use, but was implemented and improved adding with more analytes (i.e. short-chain PFAS) and lowering the Limit of Detection (LOD) from 20 ng/L to 5 ng/L.

The reference method used in drafting the procedure is the ISO 25101:2009 “Water quality – Determination of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluotoctanoate (PFOA) – Method for unfiltered samples using solid phase extraction and liquid chromatography / mass spectrometry”.

The procedure is based on the simultaneous determination of the PFAS identified in Table 1 with LC-MS technique using a triple quadrupole system in negative ElectroSpray Ionisation (-ESI) modality and with Multiple Reaction Monitoring (MRM) detection. Water samples are directly injected (on-line) after addition of the relative labeled internal standards. If the sample is particularly complex or dirty, a further off-line Solid Phase Extraction (SPE) pre-concentration and purification step is required. The range of measurement is from 5 to 500 ng/L for all analytes. In case of more contaminated samples, a dilution of the sample is necessary.

The obtained SOP is internally identified as: MW082.0CVE with Revision n. 2 of 26/03/2018.

The Validation Report with all the steps and details of the validation process for the analysis of PFAS in wastewater is attached in ANNEX I (in Italian language). The final SOP “Sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) in campioni acquosi mediante LC-MS” internally identified as MW082.0CVE is attached in ANNEX II (in Italian language).

1.2 Standard Operating Procedure for the analysis of wastewater

The method allows to determine the concentration of nine perfluoroalkylcarboxylic acids (from 4 to 12 carbon chain skeleton) and three perfluorosulfonic acids (4, 6 and 8 carbon chain skeleton) in wastewaters and aqueous samples particularly dirty or with an high organic content.

The protocol developed is based on ASTM D7979-17 “Standard Test Method for Determination of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Water, Sludge, Influent, Effluent and Wastewater by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)”. The procedure is based on the simultaneous determination of the PFAS already identified in Table 1 with LC-MS technique using a triple quadrupole system in negative ElectroSpray Ionisation (-ESI) modality and with Multiple Reaction Monitoring (MRM) detection. Water samples are directly injected (on-line) after dilution at 50 % with methanol and filtration at 0.2 µm. Then, the relative labeled internal standards are added for the quantification. The range of measurement is from 20 to 800 ng/L for all analytes, while the LOQ is 25 ng/L. In case of more contaminated samples, a dilution of the sample is necessary.

C.1 - Standard Operating Procedures (SOPs) for the analytical determination and quantification of PFAS in environmental matrices

The obtained SOP is internally identified as: MW089.0CVE with Revision n. 0 of 26/03/2018.

The Validation Report with all the steps and details of the validation process for the analysis of PFAS in wastewater is attached in ANNEX III (in Italian language). The final SOP “Sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) in campioni di acque di scarico mediante LC-MS” internally identified as MW089.0CVE is attached in ANNEX IV (in Italian language).

1.3 Standard Operating Procedure for the analysis of soil

The method allows to determine the concentration of nine perfluoroalkylcarboxylic acids (from 4 to 12 carbon chain skeleton) and three perfluorosulfonic acids (4, 6 and 8 carbon chain skeleton) in solid samples like sediments, sludge, soils and waste material.

The protocol developed is based on ASTM D7968-17 “Standard Test Method for Determination of Polyfluorinated Compounds in Soil by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)”. The procedure is based on the simultaneous determination of the PFAS already identified in Table 1 with LC-MS technique using a triple quadrupole system in negative ElectroSpray Ionisation (-ESI) modality and with Multiple Reaction Monitoring (MRM) detection. Briefly, the solid sample, previously dried, sieved and homogenized following the internal procedures in use, is extracted with methanol and water (50:50) by stirring in alkaline conditions. The sample is then centrifuged to separate the liquid phase from the solid one. The liquid phase is then filtered at 20 µm, acidified with acetic acid before the addition of the relative labeled internal standards. If the sample is particularly complex or dirty, a further off-line Solid Phase Extraction (SPE) pre-concentration and purification step is required according to the same procedure developed for water (i.e. MW082.0CVE point 8.1). Generally, the range of measurement applied at the standard condition (i.e. 2 g of solid sample extracted, 10 mL of extract solution, dilution factor 100) is from 5 µg/kg to 100 µg/kg for all analytes. The LOQ of the method depend from the objective of the analysis as well from the type of matrix involved: 3 µg/kg on dry basis as background level; 10 µg/kg on dry basis for sediment and common soil; 50 µg/kg on dry basis for industrial soils and sludge; 100 µg/kg on dry basis for waste material.

The obtained SOP is internally identified as: MR051.0CVE with Revision n. 0 of 20/09/2018.

The method was developed, internally validated and adopted by ARPAV laboratory. However, for the full validation according to EN ISO/IEC 17025:2005 standard is planned by the end of 2018, hence the *Validation Report* for this specific SOP is not yet prepared at this stage of the project. The analytical method for determination of PFAS in soil materials will be proposed for accreditation after the full validation, supposedly for 2019.

The SOP “Sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) in sedimenti, fanghi, terreni e rifiuti”, internally identified as MW051.0CVE, is attached as ANNEX V (in Italian language).

C.1 - Standard Operating Procedures (SOPs) for the analytical determination and quantification of PFAS in environmental matrices

Table 1. PFAS identified and quantified according to the procedure.

ACRONYM	SUBSTANCE	n. CARBON	MW*	CAS NUMBER**
PFBA	Perfluoro- <i>n</i> -butanoic acid	4	214	375-22-4
PFPeBA	Perfluoro- <i>n</i> -pentanoic acid	5	264	2706-90-3
PFHxA	Perfluoro- <i>n</i> -hexanoic acid	6	314	307-34-4
PFHpA	Perfluoro- <i>n</i> -heptanoic acid	7	364	375-85-9
PFOA	Perfluoro- <i>n</i> -octanoic acid	8	414	335-67-1
PFNA	Perfluoro- <i>n</i> -nonanoic acid	9	464	375-91-1
PFDA	Perfluoro- <i>n</i> -decanoic acid	10	514	335-76-2
PFUnDA	Perfluoro- <i>n</i> -undecanoic acid	11	565	2058-94-8
PFDoDA	Perfluoro- <i>n</i> -dodecanoic acid	12	614	307-55-1
PFBS	Perfluoro- <i>n</i> -butane sulfonate	4	300	375-73-5
PFHxS	Perfluoro- <i>n</i> -hexane sulfonate	6	400	355-46-4
PFOS	Perfluoro- <i>n</i> -octane sulfonate	8	500	1763-23-1

* MW: Molecular Weight; **CAS: Chemical Abstracts Service number

2 Actions taken by CNR-IRSA

In accordance with the specific aims of the *Environmental Monitoring* action, CNR-IRSA supports the other operating actions with the PFAS determination in biological samples (sub-action C.1.2).

At national level, CNR-IRSA recently coordinated the PFAS project funded by the Italian Ministry of Environment on the survey of sources and distribution of perfluorinated substances in main Italian river basins. For this reason, the analytical approach is based on well-assessed and validated methods already in use in CNR-IRSA laboratories. However, some technical aspects have to be deepened in order to adapt the current used methods to the monitored environmental matrices such as vegetable tissues.

More in details, on one hand the LIFE PHOENIX project requires the development of specific protocols that allow quantifying the short-chain PFAS. On the other hand, the selected contaminants need to be extracted from new matrices, different from those usually analysed.

2.1 Standard Operating Procedure for the analysis of vegetable and animal organisms

The method allows to determine the concentration of nine perfluoroalkylcarboxylic acids (from 4 to 12 carbon chain skeleton) and three perfluorosulfonic acids (4, 6 and 8 carbon chain skeleton) (Table 1) in samples of animals (earthworms) and vegetables (leaves, stem and root from maize, radicchio/chicory, onion and phragmites). This procedure was already in use for some aquatic organisms and then it was implemented and improved changing environmental matrices and adding more analytes (i.e. short-chain PFAS).

Sample preparation procedure was based on a sonication-assisted extraction, carried out using a slightly modified method after Lacina *et al.* (2011). The extract was spiked with SIL-IS ("Stable Isotopic Labelled-Internal Standard") and filtered through HybridSPE[®] Phospholipid Ultra cartridge to remove phospholipids by an off-line purification before injection. The following step was the on-line TFC (Turbulent Flow Chromatography) clean up, procedure effective in excluding molecules larger than 8,000-10,000 DA, such as particular proteins. The use of TFC coupled with UHPLC was performed by mean of a modified Thermo EQuan system.

The optimization of the method was subjected to the validation procedure. In particular, the matrix effect was assessed by comparing clam extracts spiked with a standard solution in acetonitrile. Moreover, linearity and sensitivity was evaluated by injecting 7 levels of multicomponent standard solutions spiked with SIL-IS. The same solutions were used also to assess the accuracy. Indeed the method precision was determined as the relative standard deviation of four replicate injections of this standard solutions or fortified extracts of clam at low and high concentrations.

C.1 - Standard Operating Procedures (SOPs) for the analytical determination and quantification of PFAS in environmental matrices

Validation steps, details on the tools settings and the limit of detection are reported in ANNEX VI (in Italian language).

3 Conclusions

The document summarises the general Standard Operating Procedures in use in the analytical laboratories of ARPAV and CNR-IRSA. Their drafting and validations are aligned with the specific LIFE PHOENIX Project requirements, in particular for the needs of operative actions B.3 and B.4. The following attached files complete the document including the details of every procedure.

File attached:

ANNEX I: Validation Report of SOP for the analysis of natural water

ANNEX II: SOP for the analysis of natural water

ANNEX III: Validation Report of SOP for the analysis of wastewater

ANNEX IV: SOP for the analysis of wastewater

ANNEX V: SOP for the analysis of soil

ANNEX VI: Procedure for the analysis of vegetable and animal organisms

Annex I

Validation Report of SOP for the analysis of natural water

SERVIZIO LABORATORIO DI VENEZIA SEDE OPERATIVA DI MESTRE

RAPPORTO DI VALIDAZIONE DEL 26/04/18

Nuova emissione Sostituisce il rapporto _____ Integra il rapporto del del 11-05-2017

1) PROGETTAZIONE

1.1 Identificazione della procedura di prova da validare

Sigla: MW82.0CVE rev.2
Titolo: Sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) in campioni acquosi mediante LC-MS
Matrice/i: acque naturali dolci (superficiali, sotterranee, potabili, minerali e meteoriche), di scarico e salmastre
Misurando/i: composti perfluoro alchilici PFAS: PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnA, PFDoA, PFBS, PFHxS, PFOS
Campo di misura: da 5 a 500 ng/L per PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFBS, PFHxS, PFOS, PFUnA, PFDoA. Concentrazioni che superano questo intervallo possono essere analizzate previa diluizione.

1.2 Identificazione del metodo di prova (cancellare le opzioni non scelte):

- Metodo ufficiale: metodo riportato o richiamato in un documento legislativo
- Metodo normalizzato non normato (es: APAT CNR IRSA, AOAC, EPA, UNICHIM...)
- Metodo non normalizzato (Rapporti ISTISAN, Quaderni IRSA)
- Metodi alternativi
- Metodo interno

Sigla e Titolo: ISO 25101:2009 "Water quality – Determination of perfluorootanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) – Method for unfiltered samples using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry"
Eventuali modifiche apportate al metodo: estensione delle sostanze perfluoroalchiliche analizzate
In seguito alle modifiche apportate e in base ai documenti prescrittivi dell'organismo di accreditamento, la procedura di prova deve essere accreditata come metodo interno?
<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO

Motivo della rivalidazione/integrazione/aggiornamento: Estensione del LOQ a 5 ng/L mediante analisi per iniezione diretta.
--

1.3 Parametri di validazione da indagare

	Parametro	Requisiti/ Criteri di accettabilità	Note
x	Intervallo di linearità	Da 5 a 500 ng/L	
x	LOQ	5 ng/L secondo PG36DL § 5.4	
x	Ripetibilità stretta	A due livelli: 1) LOQ pari a 5 ng/L per tutti gli analiti 2) a 100 ng/L per tutti gli analiti Per PFOA e PFOS $A \leq sr/\sigma_R \leq B$ Per gli altri $A \leq sr/\sigma_H \leq B$ PG36DL § 5.5.4	
x	Limite di ripetibilità	PG36DL § 5.5.3	
x	Recupero/Esattezza	Accettabilità del recupero Per PFOA e PFOS: 70 % \pm 125 % ISO 25101: 2009(E) Per gli altri PFAS: 50 % \pm 120 % PG36DL § 5.7.5	
x	Incertezza di misura	Viene mantenuto l'approccio scelto nella precedente validazione (metodo di riferimento per PFOS e PFOA) ed equazioni di Horwitz-Thomson per gli altri analiti	

1.4 Matrici su cui eseguire le prove di validazione

Acqua minerale fortificata con standard nativi certificati. Il recupero è stato calcolato fortificando alcune delle matrici acquose individuate al punto 1.1.

1.5 Programmazione delle prove

Da settembre 2017 ad aprile 2018: conferma dell'intervallo di linearità, elaborazione dei dati relativi a LOQ, verifica della validità delle carte di controllo. Esecuzione delle prove e calcolo dei seguenti parametri:

1.5.1 Ripetibilità stretta a due livelli di concentrazione :

1. Si analizzeranno 10 campioni indipendenti di acqua minerale fortificata ad un livello di concentrazione nel campione finale pari a 5 ng/L.
2. Si analizzeranno 10 campioni indipendenti di acqua minerale fortificata ad un livello di concentrazione nel campione finale pari a 100 ng/L.

1.5.2 **Limite di ripetibilità:** partendo dai dati di ripetibilità stretta ai due livelli di concentrazione sopra citati verranno calcolati i limiti di ripetibilità (PG36DL §5.5.3) e quindi verrà determinata l'equazione della retta del limite di ripetibilità per l'intero campo di misura.

1.5.3 **Esattezza:** verrà effettuata partendo dai dati di recupero (PG36DL § 5.7.1.5)

1.5.4 **Incertezza di misura:** per PFOA e PFOS ne verrà stimata l'entità in base a quanto previsto al §4 della PG37DL e confrontata con il valore che si ottiene applicando le equazioni di Horwitz – Thompson (PG37DL al § 5.4). Tali equazioni vengono adottate per tutti gli altri analiti.

1.6 **Personale coinvolto e gg persona richiesti**

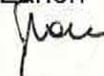
C. Cecchinato, M. Prenzato e F. Zanon: per un totale previsto di 30 giorni distribuiti nell'arco temporale sopra elencato.

1.7 **Risorse materiali richieste:** Standard certificati, vetreria e strumentazione prevista ai paragrafi §5 e §6 della PdP MW82.0CVE.

25 settembre 2017

RDU / Dirigente PAS*

F. Zanon



* o suo delegato

2) RAPPORTO FINALE

2.1 Risultati delle prove di validazione

Parametro eliminare i parametri non selezionati in tab. § 1.3	Requisiti/Criteri di accettabilità	Valore trovato	Giudi- zio ⁽¹⁾	Note ⁽²⁾
Intervallo di linearità	Da 5 a 500 ng/L	Da 5 a 500 ng/L	P	
LOQ	5 ng/L	5 ng/L	P	
Ripetibilità stretta	Per PFOA e PFOS $A \leq sr/\sigma_R \leq B$ 0.25+1.32 Per gli altri $A \leq sr/\sigma_H \leq B$ 0.25+1.32	5 ng/L 100 ng/L PFBA: 0.53 0.17* PFPeA: 0.49 0.26* PFBS: 0.39 0.12* PFHxA: 0.37 0.18* PFHpA: 0.61 0.21* PFHxS: 0.31 0.30 PFOA: 0.54 0.46 PFNA: 0.83 0.36 PFDA: 0.59 0.42 PFOS: 0.78 0.38 PFUnA: 0.67 0.67 PFDoA: 1.05 0.82	P	Per PFOA e PFOS §5.5.4 b) della PG036DL. Per gli altri PFAS §5.5.4 d) della PG036DL con σ_H corretto Thompson * Le prestazioni strumentali molto elevate migliorano i dati di ripetibilità Vedi All. 1
Limite di ripetibilità	5 ng/L 100 ng/L PFBA: $r \leq 2.14$ $r \leq 12$ PFPeA: $r \leq 1.92$ $r \leq 19$ PFBS: $r \leq 1.40$ $r \leq 8$ PFHxA: $r \leq 1.17$ $r \leq 13$ PFHpA: $r \leq 2.34$ $r \leq 16$ PFHxS: $r \leq 1.14$ $r \leq 20$ PFOA: $r \leq 1.41$ $r \leq 23$ PFNA: $r \leq 3.03$ $r \leq 26$ PFDA: $r \leq 2.34$ $r \leq 30$ PFOS: $r \leq 3.36$ $r \leq 24$ PFUnA: $r \leq 2.75$ $r \leq 55$ PFDoA: $r \leq 4.82$ $r \leq 64$	ng/L limite PFBA: 4.7-6.3=1.6 2.2 PFPeA: 5-5.8=0.8 2.0 PFBS: 5.1-6.6=1.5 1.5 PFHxA: 5.4-6.7=1.3 1.4 PFHpA: 6.3-8=1.7 2.7 PFHxS: 5.6-7.1=1.5 1.5 PFOA: 5.1-6.7=1.6 1.8 PFNA: 5.0-6.4=1.4 3.3 PFDA: 5.6-8.6=3 3.2 PFOS: 5.1-8.2=3.1 3.9 PFUnA: 4.0-6.1=2.4 2.9 PFDoA: 4.4-8.7=4.3 6.2	P	E' stata calcolata per ciascun analita la retta del limite di ripetibilità a due livelli di concentrazione pari a 10 e 400 ng/L. (vedi ripetibilità stretta PFAS.xls reperibile nella directory : UF CH Acque/validazione acque/parametri statistici/elaborazioni varie prove accreditate/LC-MS-PFAS) Le prove sperimentali per il calcolo del limite di ripetibilità sono state eseguite in data 22/3/18 su campione fortificato
Recupero/Esattezza	PFOA e PFOS: 70 % + 125 % Per gli altri PFAS: 50 % + 120 %	Vedi dati dei recuperi % riportati in All. 1	P	

⁽¹⁾ P = Positivo, N = Negativo

⁽²⁾ Inserire il percorso per eventuali collegamenti ipertestuali

2.2 Calcolo dell'incertezza di misura

Per il calcolo dell'incertezza di misura è stato mantenuto l'approccio previsto dal precedente progetto di validazione datato 11/05/17.

2.3 Espressione del risultato

Campo di misura		Cifre Decimali	Incertezza estesa % (k =2)	Unità di misura
PFBA	5 ÷ 500	0	x ± 44% x	ng/L
PFPeA	5 ÷ 500	0	x ± 44% x	ng/L
PFBS	5 ÷ 500	0	x ± 44% x	ng/L
PFHxA	5 ÷ 500	0	x ± 44% x	ng/L
PFHpA	5 ÷ 500	0	x ± 44% x	ng/L
PFHxS	5 ÷ 500	0	x ± 44% x	ng/L
PFOA	5 ÷ 500	0	x ± 44% x	ng/L
PFNA	5 ÷ 500	0	x ± 44% x	ng/L
PFDA	5 ÷ 500	0	x ± 44% x	ng/L
PFOS	5 ÷ 500	0	x ± 44% x	ng/L
PFUnA	5 ÷ 500	0	x ± 44% x	ng/L
PFDoA	5 ÷ 500	0	x ± 44% x	ng/L

2.4 Quantificazione delle risorse umane (gg persona) e materiali impiegati

E' stato confermato l'impiego di risorse preventivate nel progetto di validazione.

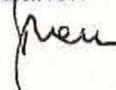
2.5 Giudizio di idoneità all'uso

Visti i risultati sperimentali della validazione, si esprime il seguente giudizio di idoneità della procedura di prova all'utilizzo previsto, a fronte dello scopo e del campo di applicazione previsti e dei criteri di accettabilità predefiniti: IDONEO NON IDONEO

Data: 26/04/18

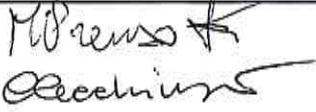
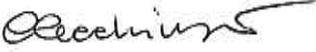
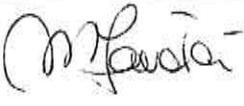
RDU / Dirigente PAS

F. Zanoni



Annex II

SOP for the analysis of natural water

ARPA Veneto 	PROCEDURA DI PROVA	MW082.0CVE Pagina n. 1 di 11 Rev. n. 2 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI ACQUOSI MEDIANTE LC MS		
TDU M. Prenzato TDU C. Cecchinato	AQ M. Favatà	PAS F. Zanon
 		
REDAZIONE	VERIFICA	APPROVAZIONE

SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS*) IN CAMPIONI ACQUOSI MEDIANTE LC MS

1. SCOPO E CAMPO D'APPLICAZIONE

Il metodo consente di determinare la concentrazione di nove acidi perfluoroalchilcarbossilici (da 4 a 12 atomi di carbonio) e tre perfluoroalchilsolfonici (4, 6 e 8 atomi di carbonio) in campioni di acque naturali dolci (superficiali, sotterranee, potabili, minerali e meteoriche) e salmastre.

Le modifiche alla revisione precedente sono evidenziate da una barra laterale.

*PFPeA, PFPBA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFBS, PFHxS, PFOS

2.1 Basi scientifiche

Il metodo è basato sulla determinazione simultanea delle sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) sopra citate mediante analisi in LC MS triplo quadrupolo con ionizzazione elettronegativa –ESI e rilevazione in modalità Multiple Reaction Monitoring (MRM). I campioni acquosi vengono analizzati per iniezione diretta previa aggiunta di opportuni standard interni marcati o per iniezione di un campione purificato e preconcentrato in SPE off line nel caso di matrici particolarmente complesse.

2.2 Intervallo di applicazione

I composti analizzati vengono riportati nella tabella A1 e il range di misura va da 5 a 500 ng/L per tutti gli analiti. Concentrazioni al di fuori di questo intervallo possono essere determinate previa diluizione.

2.3 Limite di quantificazione

Per tutti gli analiti il limite di quantificazione è pari a 5 ng/L.

3. INTERFERENZE E CAUSE D'ERRORE

I composti PFAS entrano nella composizione di diversi polimeri fluorurati potenzialmente presenti anche nel sistema analitico impiegato nel corso della presente procedura, rilasciati ad esempio da parti che compongono la strumentazione cromatografica (sistema di degasaggio in linea, guarnizioni etc.). Se possibile, sostituire le parti fluorurate con altre di diverso

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW082.0CVE Pagina n. 2 di 11 Rev. n. 2 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI ACQUOSI MEDIANTE LC MS		

materiale oppure aggirarle. Se necessario, aggiungere in linea una precolonna C18 a monte dell'iniettore per ritardare l'uscita dei contaminanti.

Per evitare il più possibile le contaminazioni è buona norma sciacquare rigorosamente prima dell'uso con diclorometano e metanolo tutta l'attrezzatura che entra in contatto con il campione. Nel caso di preparazione del campione mediante SPE off line per ogni serie di campioni analizzati viene analizzato anche un bianco di processo.

Interferenze positive o negative possono essere causate anche dal tipo di contenitore in cui viene posto il campione al momento del prelievo (es. sottotappi in teflon danno interferenza positiva mentre il vetro può rappresentare un punto di adsorbimento degli analiti ricercati) e per evitare ciò vengono impiegate bottiglie in polipropilene lavate senza utilizzo di detergenti.

4. RIFERIMENTI

ISO 25101:2009

5. APPARECCHIATURA E ATTREZZATURE

5.1 Apparecchiature

5.1.1 HPLC LC-30AD XR Shimadzu abbinato all'autocampionatore CTC PAL HTS XT e interfacciato allo spettrometro di massa API 6500 AB Sciex triplo quadrupolo CAP725

5.1.2 Sistema di acquisizione dati ed integrazione Analyst TM 1.6.3 abbinato a MULTIQUNT 3.02

5.1.3 Centrifuga sottovuoto

5.2 Attrezzature

5.2.1 Colonna cromatografica Kinetex Evo C18 1.7 µm C18 2.1 x 100 mm o C18 XTerra MS C18 3.5 µm 2.1 x 100 mm o Raptor C18 5 µm 2.1 x 100 mm.

5.2.2 Provette graduate da 10 mL in vetro lavate con diclorometano e metanolo

5.2.3 Micropipetta Eppendorf con scarica multipla e variabile con serbatoio in polipropilene o micropipetta equivalente

5.2.4 Manifold Supelco Visiprep a 12 posizioni

5.2.5 Cartucce SPE OASIS WAX Waters 6mL con 150 mg di fase stazionaria e granulometria pari a 30 µm

5.2.6 Vials da 2 mL in polipropilene

5.2.7 Micropipette a volume variabile tarate da 20 µL a 5000 µL

5.2.8 Filtri in acetato di cellulosa rigenerato 0.2 µm

5.2.9 Provette falcon in polipropilene da 50 mL

6. REATTIVI E STANDARD

6.1 Reattivi

6.1.1 acqua ultrapura per LC MS

6.1.2 metanolo per LC MS

6.1.3 diclorometano

6.1.4 soluzione di acetato di ammonio 25 mM a pH 4

6.1.5 soluzione di acetato di ammonio 2 mM

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW082.0CVE Pagina n. 3 di 11 Rev. n. 2 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI ACQUOSI MEDIANTE LC MS		

- 6.1.6 soluzione acquosa di ammoniaca 30-33% PA
- 6.1.7 metanolo allo 0.1% di ammoniaca
- 6.1.8 Fase mobile A: acqua ultrapura 2mM acetato di ammonio al 5% di MeOH
- 6.1.9 Fase mobile B: MeOH LC-MS-ACN LC-MS 2:8
- 6.1.10 Sodio Tiosolfato pentaidrato soluzione al 10%
- 6.1.11 Acido acetico
- 6.1.12 Acetato di ammonio
- 6.1.13 Acetonitrile LC-MS (ACN)

6.2 Standard

6.2.1 Standard soluzioni madre a 5 mg/L e Mix a 2 mg/L.

A partire dalle soluzioni certificate riportate nella seguente tabella A1, si preleva 1 mL di ciascun composto e si diluisce con metanolo di cui al punto 6.1.2 in matraccio da 10 mL, ottenendo le soluzioni singole a 5 mg/L certificate degli standard nativi e marcati.

Le soluzioni a 5 mg/L così ottenute vengono aliquotate in vials da 2 mL in polipropilene e conservate a 4°C al buio. Le soluzioni così ottenute vengono diluite come riportato al punto 6.2.2.

Tabella A1
Preparazione delle soluzioni standard di PFAS a 5 mg/L

STD Nativi					
		mL	µg/mL		
	soluzioni metanoliche di:	Quantità	Conc	peso molecolare	N° CAS
PFBA	Perfluoro-n-butanoic acid	1.2	50	214	375-22-4
PFPeA	Perfluoro-n-pentanoic acid	1.2	50	264	2706-90-3
PFHxA	Perfluoro-n-hexanoic acid	1.2	50	314	307-24-4
PFHpA	Perfluoro-n-heptanoic acid	1.2	50	364	375-85-9
PFOA	Perfluoro-n-octanoic acid	1.2	50	414	335-67-1
PFNA	Perfluoro-n-nonanoic acid	1.2	50	464	375-91-1
PFDA	Perfluoro-n-decanoic acid	1.2	50	514	335-76-2
PFUdA	Perfluoro-n-undecanoic acid	1.2	50	564	2058-94-8
PFDoA	Perfluoro-n-dodecanoic acid	1.2	50	614	307-55-1
L-PFBS	Potassium perfluoro-1-butanesulfonate	1.2	50	300	375-73-5
L-PFHxS	Sodium perfluoro-1-hexanesulfonate	1.2	50	400	355-46-4
L-PFOS	Sodium perfluoro-1-octanesulfonate	1.2	50	500	1763-23-1
STD interni marcati					
		mL	µg/mL		
	soluzioni metanoliche di:	Quantità	Conc	peso molecolare	
MPFBA	Perfluoro-n-[¹³ C ₄]butanoic acid	1.2	50	218.01	n.d.
M3PFPeA	Perfluoro-n-[3,4,5- ¹³ C ₃]Pentanoic acid	1.2	50	267.02	n.d.
MPFHxA	Perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]Hexanoic acid	1.2	50	316.04	n.d.
MPFOA	Perfluoro-n-[1,2,3,4- ¹³ C ₄]Octanoic acid	1.2	50	418.04	n.d.
MPFNA	Perfluoro-n-[1,2,3,4,5- ¹³ C ₅]Nonanoic acid	1.2	50	469.04	n.d.
MPFDA	Perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]decanoic acid	1.2	50	516.07	n.d.
MPFUdA	Perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]undecanoic acid	1.2	50	566.08	n.d.
MPFDoA	Perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]dodecanoic acid	1.2	50	616.08	n.d.
MPFHxS	Sodium perfluoro-1-hexane[¹⁸ O ₂]sulfonate	1.2	50	426.1	n.d.
MPFOS	Sodium perfluoro-1-[1,2,3,4- ¹³ C ₄]octanesulfonate	1.2	50	526.08	n.d.

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW082.0CVE
		Pagina n. 4 di 11 Rev. n. 2 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI ACQUOSI MEDIANTE LC MS		

In alternativa agli standard singoli può essere acquistata una miscela di standard nativi certificata già pronta avente la composizione riportata nella tabella A2. Tale miscela viene diluita seguendo le indicazioni riportate al punto 6.2.2.

Tabella A2
Preparazione delle soluzioni standard di PFAS a 2 mg/L

Miscela di STD nativi (mix)			
Soluzioni in acetone		Quantità mL	Conc mg/L
PFBA	Perfluoro-n-butanoic acid	1.2	2
PFPeA	Perfluoro-n-pentanoic acid	1.2	2
PFHxA	Perfluoro-n-hexanoic acid	1.2	2
PFHpA	Perfluoro-n-eptanoic acid	1.2	2
PFOA	Perfluoro-n-octanoic acid	1.2	2
PFNA	Perfluoro-n-nonanoic acid	1.2	2
PFDA	Perfluoro-n-decanoic acid	1.2	2
PFUnDA	Perfluoro-n-undecanoic acid	1.2	2
PFDoDA	Perfluoro-n-dodecanoic acid	1.2	2
PFBS	Potassium Perfluoro-1-butane sulfonate	1.2	1.77
PFHxS	Sodium Perfluoro-1-hexane sulfonate	1.2	1.89
PFOS	Sodium Perfluoro-1-octane sulfonate	1.2	1.91

6.2.2 Soluzioni mix intermedie a 100 µg/L di standard nativi

Partendo dalle soluzioni madre singole a 5 mg/L o dal mix a 2 mg/L di cui al punto 6.2.1, si prepara una soluzione mix degli standard nativi a 100 µg/L in metanolo 6.1.2. Le soluzioni così ottenute vengono aliquotate in vials da 2 mL in polipropilene e conservate a 4°C al buio .

6.2.3 Soluzioni mix intermedie a 100 µg/L di standard interni marcati

Partendo dalle soluzioni madre a 5 mg/L di standard marcati, si prepara una soluzione mix in metanolo a 100 µg/L. Le soluzioni così ottenute vengono aliquotate in vials da 2 mL in polipropilene e conservate a 4°C al buio.

6.2.4 Soluzioni standard mix intermedie a 10 µg/L, 1 µg/L 0.1 µg/L

6.2.4.1 Soluzione intermedia a 10 µg/L

Prelevare 50 µL della soluzione a 100 µg/L degli standard mix nativi (6.2.2) e diluirla con metanolo (6.1.2) in 0.5mL finali in vial.

6.2.4.2 Soluzione intermedia a 1 µg/L

Prelevare 50 µL della soluzione a 10 µg/L degli standard mix nativi (6.2.4.1) e diluirla con metanolo (6.1.2) in 0.5mL finali in vial.

6.2.4.3 Soluzione intermedia a 0.1 µg/L

Prelevare 50 µL della soluzione a 1 µg/L degli standard mix nativi (6.2.4.2) e diluirla con metanolo (6.1.2) in 0.5mL finali in vial

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW082.0CVE Pagina n. 5 di 11 Rev. n. 2 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI ACQUOSI MEDIANTE LC MS		

6.2.5 Soluzioni standard mix curva di taratura

Preparare la curva di taratura secondo la tabella B

Tabella B

Preparazione delle soluzioni standard di taratura

STD Taratura	volume prelievo (µL)	Soluzione di Prelievo	volume (µL) MilliQ (6.1.12)	Volume prelievo IS Standard (µL)	Soluzione di Prelievo 150 ng/L IS	volume finale (mL)
Bianco	0	0	1000	200	6.2.8 (150 µg/L)	1.2
STD5	50	6.2.4.3 (0.1 µg/L)	950	200	6.2.8 (150 µg/L)	1.2
STD10	100	6.2.4.3 (0.1 µg/L)	900	200	6.2.8 (150 µg/L)	1.2
STD25	25	6.2.4.2 (1 µg/L)	975	200	6.2.8 (150 µg/L)	1.2
STD50	50	6.2.4.2 (1 µg/L)	950	200	6.2.8 (150 µg/L)	1.2
STD100	100	6.2.4.2 (1 µg/L)	900	200	6.2.8 (150 µg/L)	1.2
STD200	20	6.2.4.1 (10 µg/L)	980	200	6.2.8 (150 µg/L)	1.2
STD500	50	6.2.4.1 (10 µg/L)	950	200	6.2.8 (150 µg/L)	1.2

6.2.6 Soluzioni concentrate di 8000 ng/L e 800 ng/L per Spike e carte di controllo

6.2.6.1

La soluzione a 8000 ng/L viene preparata diluendo 400 µL di mix nativi a 100 µg/L (6.2.2) in 5 ml di metanolo (6.1.2)

Viene successivamente aliquotato in 3 vials da 2 mL. Tale soluzione è stabile per 2 mesi.

6.2.6.2 Mix intermedio 800 ng/L

Prelevare 50 µL dalla soluzione a 8000 ng/L (6.2.6.1) e diluirla con metanolo in vial a 0.5 ml finali Tale soluzione viene preparata ad ogni sessione analitica.

6.2.7 Soluzioni per carte di controllo 20 ng/L e 200 ng/L

Preparare le carte di controllo da mettere nella curva seguendo la tabella C

Tabella C

Preparazione delle soluzioni per carte di controllo

	volume prelievo (µL)	Soluzione di Prelievo	Conc. CC ng/L	volume (µL) MilliQ (6.1.1)	Volume prelievo IS Standard (µL)	Soluzione di Prelievo 150 ng/L IS	volum e finale (mL)
Carta di Controllo (CC) 4%	25	6.2.6.2 (800 ng/L)	20	975	200	6.2.8 (150 µg/L)	1.2
Carta di Controllo (CC) 40%	25	6.2.6.1 (8000 ng/L)	200	975	200	6.2.8 (150 µg/L)	1.2

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW082.0CVE Pagina n. 6 di 11 Rev. n. 2 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI ACQUOSI MEDIANTE LC MS		

6.2.8 Soluzione Standard interno 150 ng/L

Prelevare 75 µL di STD interno mix intermedio IS a 100 µg/L (6.2.3) e diluirlo a 50 mL con metanolo (6.1.2) aggiungere 0.6 mL di Acido Acetico 6.1.11 (concentrazione di acido acetico nel campione finale in vial 0.2%).

7. CONSERVAZIONE E PRETRATTAMENTO DEL CAMPIONE

I campioni vengono aliquotati in provetta di polipropilene da 50 mL e addizionati con 50 µL di soluzione di sodio tiosolfato (punto 6.1.10), vanno conservati a 4°C al buio ed analizzati entro 15 giorni. Nel caso in cui non si possano analizzare in questo arco di tempo, i campioni vanno congelati.

8. PROCEDIMENTO

1 mL di campione viene prelevato e trasferito in una vial da 2 mL (5.2.6) precedentemente addizionata con 200 µL di standard interno (6.2.8) a 150 ng/L (25 ng/L conc. finale). Nel caso di matrici particolarmente complesse procedere come descritto al punto 8.1.

8.1 Purificazione e preconcentrazione mediante SPE

Le cartucce SPE OASIS WAX (punto 5.2.5) vengono lavate con 4 mL MeOH (6.1.2) allo 0.1% di soluzione acquosa di ammoniaca (6.1.6) e successivamente condizionate con altri 4 mL di MeOH (6.1.2) e 4 mL di acqua ultrapura (6.1.1). I flussi sono regolati esclusivamente dalla gravità.

Una volta condizionata la cartuccia, vengono caricati 5 mL di campione addizionato di 1 mL di soluzione di standard interno a 150 ng/L (6.2.7). Successivamente si eseguono un primo lavaggio con 4 mL di soluzione di acetato di ammonio 25 mM a pH 4 (punto 6.1.4) e un secondo lavaggio con 4 mL MeOH (6.1.2). Si procede quindi all'eluizione degli analiti con 4 mL di MeOH addizionato con 0.1% di ammoniaca e si raccoglie in provetta graduata da 10 mL, avendo l'accortezza di recuperare tutto l'eluato. A questo scopo applicare al termine dell'eluizione un leggero flusso di aria in modo da recuperare tutto il liquido presente.

Portare a secco in centrifuga sottovuoto (punto 5.1.4), riprendere l'estratto con 1000 µL di acqua MilliQ (6.1.1) al 20 % di MeOH e trasferire in vial (punto 5.2.6).

8.2 Condizioni strumentali del sistema LC MS

Di seguito sono elencate le condizioni strumentali concernenti il sistema cromatografico e lo spettrometro di massa.

8.2.1 Condizioni cromatografiche

8.2.1.1 Flusso 0.15 mL /min (con Kinetex EVO C18)

8.2.1.2 Volume di iniezione 80 µL

8.2.1.3 Termostatazione della colonna a 40 °C

8.2.1.4 Gradiente: la fase mobile è costituita dalle soluzioni A (acqua ultrapura 2mM acetato di ammonio) e B (MeOH-ACN 2-8) di cui ai punti 6.1.8 e 6.1.9 ed è composta come descritto nella Tabella D che segue:

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW082.0CVE Pagina n. 7 di 11 Rev. n. 2 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI ACQUOSI MEDIANTE LC MS		

Tabella D

Composizione del gradiente HPLC

Tempo (min)	%A	%B
1.00	100	0
1.50	60	40
14.0	8	92
15.0	0	100
18.0	0	100
20.0	100	0
21.0	100	0

8.2.2 Impostazioni dello spettrometro di massa

Nelle Tabelle E ed F sono descritte le impostazioni dello spettrometro di massa:

Tabella E

Parametri della sorgente di ionizzazione

Sorgente di ionizzazione	ESI Spray voltage: -4500V Temperatura in sorgente: 350°C Ion source turbo spray: Curtain gas: 25 psig Ion source gas 1: 36 psig Ion source gas 2: 50 psig
Condizioni di ionizzazione	Ionizzazione negativa
Modalità di acquisizione degli ioni	Multiple reaction monitoring (MRM) come in Tabella F
Gas di collisione	Azoto
Pressione del gas di collisione	9 L/min

Tabella F

Parametri spettrometro di massa

	Q1 mass	Q3 mass	DP (Volts)	EP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
PFBA	212.9	168.9	-11	-10	-12	-10
PFPeA	262.9	218.7	-11	-10	-11	-10
PFHxA 1	312.9	119.1	-11	-10	-12	-10
PFHxA 2	312.9	268.9	-11	-10	-28	-10
PFHpA 1	362.9	169	-11	-10	-15	-10
PFHpA 2	362.9	318.9	-10	-10	-20	-10
PFOA 1	412.9	169	-35	-10	-15	-10
PFOA 2	412.9	368.9	-35	-10	-20	-10
PFNA 1	462.9	218.9	-20	-10	-14	-10
PFNA 2	462.9	418.9	-20	-10	-23	-10
PFDA 1	512.9	268.9	-20	-10	-17	-10
PFDA 2	512.9	468.9	-20	-10	-25	-10
PFUnDA 1	562.9	268.8	-20	-10	-17	-10

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW082.0CVE
		Pagina n. 8 di 11 Rev. n. 2 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI ACQUOSI MEDIANTE LC MS		

	Q1 mass	Q3 mass	DP (Volts)	EP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
PFUnDA_2	562.9	518.8	-20	-10	-27	-10
PFDoDA_1	612.9	318.8	-24	-10	-20	-15
PFDoDA_2	612.9	569.9	-24	-10	-28	-15
PFBS_1	298.9	80.2	-61	-10	-64	-10
PFBS_2	298.9	99.1	-61	-10	-36	-10
PFHxS_1	398.9	80.1	-70	-10	-85	-15
PFHxS_2	398.9	99	-70	-10	-80	-15
PFOS_1	498.9	80	-85	-8	-108	-10
PFOS_2	498.9	99.1	-85	10	-96	-10
MPFBA	216.9	171.9	-15	-10	-14	-12
MPFHxA	314.9	269.9	-20	-10	-13	-9
MPFOA	416.9	371.9	-20	-10	-15	-9
MPFNA	467.9	422.9	-20	-8	-15	-10
MPFDA	514.9	469.9	-20	-15	-15	-10
MPFUdA	564.9	519.8	-15	-15	-18	-10
MPFDoA	614.9	569.9	-30	-10	-20	-30
MPFHxS	402.9	103	-10	-15	-44	-6
MPFOS	502.9	99.1	-85	-9	-95	-6
MPFPeA	266	222	-10	-8	-11	-6

8.3 Bianco di processo

Nel caso dell'analisi mediante iniezione diretta il bianco viene valutato analizzando l'acqua MilliQ (6.1.1) con cui vengono effettuate le diluizioni degli standard secondo le modalità sopra descritte. Nel caso di purificazione del campione con SPE off line per la preparazione del Bianco di processo trattare 1 mL di acqua MilliQ (6.1.1) come descritto nel punto 8.1.

8.4 Recupero

Per la valutazione del recupero si utilizza un campione reale fortificato ottenuto aggiungendo 50 µL di soluzione 8000 ng/L (6.2.6.1) in 5 mL di campione reale e poi procedendo come al punto 8 o come al punto 8.1, nel caso di matrici particolarmente complesse.

9. TARATURA

Si utilizzano gli Standard multicomponenti di cui alla Tabella B per calcolare le curve di taratura su 7 livelli di concentrazione (più un bianco), impiegando il metodo dello standard interno. Le tarature così effettuate individuano un range di concentrazione effettiva nel campione che va da 5 a 500 ng/L.

9.1 Taratura e preparazione della sequenza di campioni da analizzare (batch d'analisi)

Il batch d'analisi viene preparato mettendo in successione il bianco, gli standard (7 livelli), le soluzioni delle carte di controllo (20 ng/L e 200 ng/L) e i campioni seguendo lo schema di seguito riportato:

Bianco, STD5, STD10, STD25, STD50, STD100, STD200, STD500, CC 20 ng/L CC 200 ng/L Campione1, Campione2... Campione 40. Nella sequenza va inserito almeno uno Spike 80 ng/L (8.4) e nel caso di matrici complesse (SPE off line), un bianco processo e uno spike 80 ng/L processo (vedi punto 8.3 e 8.4).

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW082.0CVE Pagina n. 9 di 11 Rev. n. 2 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI ACQUOSI MEDIANTE LC MS		

Al termine della sequenza si riproccesseranno 2 STD uno a bassa concentrazione (es. STD10, STD50) e uno ad alta concentrazione (es. STD100 STD200) che dovranno rientrare nel 20% di tolleranza per ritenere valida la sequenza.

10. CALCOLI ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Prima di procedere alla stima della concentrazione è necessario verificare la corretta identificazione dell'analita in esame controllando che vengano rispettate le seguenti condizioni:

- 1) il rapporto tra le transizioni (ove possibili) non deve mai superare il $\pm 25\%$ della media del rapporto di transizione degli std di taratura per PFOA e PFOS. Non deve superare il 30% per gli altri analiti.
- 2) il rapporto tra tempo di ritenzione dell'analita e quello dello std interno (RT relativo) non deve mai superare $\pm 0.5\%$ la media del rapporto di transizione degli std di taratura per PFOA e PFOS. Per gli altri analiti lo scostamento massimo dalla media non deve superare il $\pm 1\%$ del suddetto rapporto.

10.1 Calcoli

Le concentrazioni degli analiti si ricavano dalla curva di taratura costruita per ciascun composto.

Nel caso la concentrazione di un campione risulti superare il limite massimo del range di cui al punto 9, il campione viene diluito opportunamente e riproccessato come indicato nel paragrafo 8 e 8.1.

Il risultato viene fornito direttamente dal report strumentale in ng/L, tenendo in considerazione eventuali diluizioni.

Nel caso di preparazione "off line" il risultato strumentale viene diviso per il fattore di concentrazione e riportato alla concentrazione del campione di partenza espressa in ng/L.

$$[C] \text{ ng/L} = \frac{[c] \times 1000 \times \text{Vol Fin}}{\text{Vol Prel}}$$

dove Vol Prel è il volume di campione passato in SPE in mL, Vol Fin è il volume a cui si porta l'eluato dopo secchezza, [c] è la concentrazione in $\mu\text{g/L}$ letta allo strumento.

I risultati vengono espressi senza cifre decimali.

11. PARAMETRI STATISTICI

11.1 Criteri accettabilità della curva di taratura

La taratura viene effettuata in ogni sessione d'analisi valutando il coefficiente di correlazione che deve essere $r > 0.990$ inoltre le due carte di controllo devono rispettare i criteri al paragrafo 11.4.

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW082.0CVE
		Pagina n. 10 di 11 Rev. n. 2 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI ACQUOSI MEDIANTE LC MS		

11.2 Recupero

I recuperi vengono stimati impiegando diverse matrici reali (acqua potabile, acqua superficiale, acqua sotterranea e acqua salata) fortificate a concentrazione intorno a 80 ng/L.

I risultati ottenuti per ciascun composto sono riportati nella Tabella G che segue:

Tabella G

PFBA	PFPeA	PFBS	PFHxA	PFHpA	PFHxS	PFOA	PFNA	PFDA	PFOS	PFUnA	PFDoA
111%	108%	115%	111%	114%	114%	123%	113%	103%	107%	103%	114%
90%	92%	91%	95%	94%	88%	88%	84%	73%	76%	70%	77%

I recuperi sono compresi tra il 76 % e 123 % per PFOA e PFOS e tra il 70 % e 115 % per gli altri analiti

Il recupero è ritenuto valido se compreso tra il 70% e il 125% per PFOA e PFOS e tra 50 e 120.

11.3 Carte di controllo

Il processo analitico viene tenuto sotto controllo mediante carte di controllo sulle sostanze perfluoroalchiliche più significative: PFBA, PFBS, PFOA, PFOS.

Le carte di controllo (CC) vengono effettuate analizzando dei materiali di riferimento a due livelli di concentrazione a 20 ng/L e uno a 200 ng/L (vedi punto 6.2.7).

I valori delle C.C. vengono valutati secondo quanto previsto dalla PG07DL "Carte di controllo". Nel caso in cui uno o più valori della carta di controllo superi i limiti di controllo ma risulti essere all'interno dell'intervallo d'incertezza, i risultati vengono considerati validi.

Nel caso in cui uno o più valori della carta di controllo non rientrino all'interno dell'intervallo d'incertezza si valuterà la possibilità di accettare o meno i risultati del batch analitico.

11.4 STD di controllo batch

Dopo 40 campioni analizzati o alla fine della sequenza d'analisi (punto 9.1) si rileggono uno STD basso ed uno alto assegnando la funzione quality control. Se i valori rientrano nel 20% del valore teorico le condizioni strumentali vengono ritenute costanti nel tempo dell'analisi.

11.5 Incertezza di misura

E' stata calcolata secondo quanto previsto dalla PG37DL "Valutazione e controllo dell'incertezza di misura per prove chimiche e fisiche" seguendo le modalità indicate nel progetto di validazione. I risultati ottenuti sono riassunti nel rapporto di validazione.

11.6 Partecipazione a ring test

Il laboratorio partecipa al proficiency test AQUACHECK AQ-26 i risultati sono raccolti nel quaderno dei ring test.

12. NORMATIVA

La normativa di riferimento si trova in intranet al seguente indirizzo:

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW082.0CVE Pagina n. 11 di 11 Rev. n. 2 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI ACQUOSI MEDIANTE LC MS		

<http://intranet/> Documenti / Dipartimento Regionale Laboratori / Qualità / DL / 04 -
DOCUMENTI DI ORIGINE ESTERNA / Metodi di Prova e Documenti legislativi correlati

13. BIBLIOGRAFIA

USEPA (2009) Method 537. Determination of Selected Perfluorinated Alkyl Acid in Drinking Water by Solid Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS) Version 1.1 Document EPA/600/R-08/092, September 2009

Notiziario IRSA anno 2013 volume 1

Annex III

Validation Report of SOP for the analysis of wastewater

SERVIZIO LABORATORIO DI VENEZIA SEDE OPERATIVA DI MESTRE

RAPPORTO DI VALIDAZIONE DEL 03/05/2018

Nuova emissione Sostituisce il rapporto _____ Integra il rapporto del

1) PROGETTAZIONE

1.1 Identificazione della procedura di prova da validare

Sigla: MW089.0CVE
Titolo: Sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) in campioni di acque di scarico mediante LC-MS
Matrice/i: acque di scarico
Misurando/i: composti perfluoroalchilici PFAS: PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnA, PFDoA, PFBS, PFHxS, PFOS
Campo di misura: da 25 a 800 ng/L per PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFBS, PFHxS, PFOS, PFUnA, PFDoA. Concentrazioni che superano questo intervallo possono essere analizzate previa diluizione.

1.2 Identificazione del metodo di prova (cancellare le opzioni non scelte):

- Metodo ufficiale: metodo riportato o richiamato in un documento legislativo
- Metodo normalizzato non normato (es: APAT CNR IRSA, AOAC, EPA, UNICHIM...)
- Metodo non normalizzato (Rapporti ISTISAN, Quaderni IRSA)
- Metodi alternativi
- Metodo interno

ASTM D7979-17 Standard test Method for determination of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Water, Sludge, Influent, Effluent and Wastewater by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS)

In seguito alle modifiche apportate e in base ai documenti prescrittivi dell'organismo di accreditamento, la procedura di prova deve essere accreditata come metodo interno?

SI NO

Motivo della rivalidazione/integrazione/aggiornamento:

1.3 Parametri di validazione da indagare.

	Parametro	Requisiti/ Criteri di accettabilità	Note
x	Intervallo di linearità	Da 20 a 800 ng/L	
x	LOQ	25 ng/L	
x	Ripetibilità stretta	A due livelli: 1) LOQ pari a 25 ng/L per tutti gli analiti 2) a 100 ng/L per tutti gli analiti Per tutti gli analiti $A \leq sr/\sigma_H \leq B$ PG36DL § 5.5.4	
x	Limite di ripetibilità	PG36DL § 5.5.3	
x	Recupero/Esattezza	Accettabilità del recupero Per PFOA e PFOS: 70 % ÷ 130 %	
x	Incertezza di misura	Verrà valutata considerando le equazioni di Horwitz-Thompson	

1.4 Matrici su cui eseguire le prove di validazione

Acque di scarico fortificata con standard nativi certificati. Il recupero è stato calcolato fortificando alcune delle matrici individuate al punto 1.1.

1.5 Programmazione delle prove

Da gennaio a maggio 2018: conferma dell'intervallo di linearità, elaborazione dei dati relativi a LOQ, ripetibilità e carte di controllo. Esecuzione delle prove e calcolo dei seguenti parametri:

1.5.1 Ripetibilità stretta a due livelli di concentrazione :

1. Si analizzeranno 10 campioni indipendenti di acqua di scarico fortificata ad un livello di concentrazione nel campione finale pari a 25 ng/L.
2. Si analizzeranno 10 campioni indipendenti di acqua scarico fortificata ad un livello di concentrazione nel campione finale pari a 100 ng/L.

1.5.2 Limite di ripetibilità: partendo dai dati di ripetibilità stretta ai due livelli di concentrazione sopra citati verranno calcolati i limiti di ripetibilità (PG36DL §5.5.3) e quindi verrà determinata l'equazione della retta del limite di ripetibilità per l'intero campo di misura.

1.5.3 Esattezza: verrà effettuata partendo dai dati di recupero (PG36DL § 5.7.1.5)

1.5.4 Incertezza di misura: calcolo dell'incertezza di misura mediante le equazioni di Horwitz – Thompson (PG37DL al § 5.4).

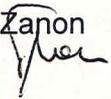
1.6 Personale coinvolto e gg persona richiesti

C. Cecchinato, M. Prenzato e F. Zanon: per un totale previsto di 30 giorni distribuiti nell'arco temporale sopra elencato.

1.7 Risorse materiali richieste: Standard certificati, vetreria e strumentazione prevista ai paragrafi §5 e §6 della PdP MW089.0CVE.

18 gennaio 2018

RDU / Dirigente PAS*

F. Zanon


* o suo delegato

2) RAPPORTO FINALE

2.1 Risultati delle prove di validazione

Parametro eliminare i parametri non selezionati in tab. § 1.3	Requisiti/Criteri di accettabilità	Valore trovato	Giudi- zio ⁽¹⁾	Note ⁽²⁾																																																				
Intervallo di linearità	Da 20 a 800 ng/L	Da 20 a 800 ng/L	P																																																					
LOQ	25 ng/L	25 ng/L	P																																																					
Ripetibilità stretta	$A \leq sr/\sigma_H \leq B$ 0.25÷1.32	<table border="0"> <tr> <td>25 ng/L</td> <td>100 ng/L</td> </tr> <tr> <td>PFBA: 0.54</td> <td>0.46</td> </tr> <tr> <td>PFPeA: 0.30</td> <td>0.51</td> </tr> <tr> <td>PFBS: 0.64</td> <td>0.44</td> </tr> <tr> <td>PFHxA: 0.24*</td> <td>0.61</td> </tr> <tr> <td>PFHpA: 0.30</td> <td>0.51</td> </tr> <tr> <td>PFHxS: 0.49</td> <td>0.44</td> </tr> <tr> <td>PFOA: 0.27</td> <td>0.24*</td> </tr> <tr> <td>PFNA: 0.55</td> <td>0.25</td> </tr> <tr> <td>PFDA: 0.78</td> <td>0.30</td> </tr> <tr> <td>PFOS: 0.53</td> <td>0.68</td> </tr> <tr> <td>PFUnA: 0.52</td> <td>0.34</td> </tr> <tr> <td>PFDoA: 0.66</td> <td>0.31</td> </tr> </table>	25 ng/L	100 ng/L	PFBA: 0.54	0.46	PFPeA: 0.30	0.51	PFBS: 0.64	0.44	PFHxA: 0.24*	0.61	PFHpA: 0.30	0.51	PFHxS: 0.49	0.44	PFOA: 0.27	0.24*	PFNA: 0.55	0.25	PFDA: 0.78	0.30	PFOS: 0.53	0.68	PFUnA: 0.52	0.34	PFDoA: 0.66	0.31	P	Per PFOA e PFOS §5.5.4 b) della PG036DL. Per gli altri PFAS §5.5.4 d) della PG036DL con σ_H corretto Thompson * Le prestazioni strumentali molto elevate migliorano i dati di ripetibilità Vedi All. 1																										
25 ng/L	100 ng/L																																																							
PFBA: 0.54	0.46																																																							
PFPeA: 0.30	0.51																																																							
PFBS: 0.64	0.44																																																							
PFHxA: 0.24*	0.61																																																							
PFHpA: 0.30	0.51																																																							
PFHxS: 0.49	0.44																																																							
PFOA: 0.27	0.24*																																																							
PFNA: 0.55	0.25																																																							
PFDA: 0.78	0.30																																																							
PFOS: 0.53	0.68																																																							
PFUnA: 0.52	0.34																																																							
PFDoA: 0.66	0.31																																																							
Limite di ripetibilità	<table border="0"> <tr> <td>25 ng/L</td> <td>100 ng/L</td> </tr> <tr> <td>PFBA: $r \leq 9.5$</td> <td>$r \leq 35$</td> </tr> <tr> <td>PFPeA: $r \leq 5.6$</td> <td>$r \leq 27$</td> </tr> <tr> <td>PFBS: $r \leq 11.0$</td> <td>$r \leq 39$</td> </tr> <tr> <td>PFHxA: $r \leq 4.8$</td> <td>$r \leq 45$</td> </tr> <tr> <td>PFHpA: $r \leq 5.8$</td> <td>$r \leq 24$</td> </tr> <tr> <td>PFHxS: $r \leq 9.6$</td> <td>$r \leq 41$</td> </tr> <tr> <td>PFOA: $r \leq 6.0$</td> <td>$r \leq 15$</td> </tr> <tr> <td>PFNA: $r \leq 9.2$</td> <td>$r \leq 18$</td> </tr> <tr> <td>PFDA: $r \leq 11$</td> <td>$r \leq 18$</td> </tr> <tr> <td>PFOS: $r \leq 8.0$</td> <td>$r \leq 39$</td> </tr> <tr> <td>PFUnA: $r \leq 6.1$</td> <td>$r \leq 23$</td> </tr> <tr> <td>PFDoA: $r \leq 7.3$</td> <td>$r \leq 22$</td> </tr> </table>	25 ng/L	100 ng/L	PFBA: $r \leq 9.5$	$r \leq 35$	PFPeA: $r \leq 5.6$	$r \leq 27$	PFBS: $r \leq 11.0$	$r \leq 39$	PFHxA: $r \leq 4.8$	$r \leq 45$	PFHpA: $r \leq 5.8$	$r \leq 24$	PFHxS: $r \leq 9.6$	$r \leq 41$	PFOA: $r \leq 6.0$	$r \leq 15$	PFNA: $r \leq 9.2$	$r \leq 18$	PFDA: $r \leq 11$	$r \leq 18$	PFOS: $r \leq 8.0$	$r \leq 39$	PFUnA: $r \leq 6.1$	$r \leq 23$	PFDoA: $r \leq 7.3$	$r \leq 22$	<table border="0"> <tr> <td>80 ng/L ca.</td> <td>Limite</td> </tr> <tr> <td>PFBA: 68-75=7</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>PFPeA: 74-82=8</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>PFBS: 88-78=10</td> <td>29</td> </tr> <tr> <td>PFHxA: 82-85=3</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>PFHpA: 77-81=4</td> <td>31</td> </tr> <tr> <td>PFHxS: 91-65=26</td> <td>28</td> </tr> <tr> <td>PFOA: 77-89=12</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>PFNA: 74-85=11</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td>PFDA: 77-91=14</td> <td>19</td> </tr> <tr> <td>PFOS: 70-76=6</td> <td>36</td> </tr> <tr> <td>PFUnA: 71-83=12</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>PFDoA: 77-85=8</td> <td>19</td> </tr> </table>	80 ng/L ca.	Limite	PFBA: 68-75=7	25	PFPeA: 74-82=8	30	PFBS: 88-78=10	29	PFHxA: 82-85=3	35	PFHpA: 77-81=4	31	PFHxS: 91-65=26	28	PFOA: 77-89=12	15	PFNA: 74-85=11	16	PFDA: 77-91=14	19	PFOS: 70-76=6	36	PFUnA: 71-83=12	20	PFDoA: 77-85=8	19	P	E' stata calcolata per ciascun analita la retta del limite di ripetibilità a due livelli di concentrazione pari a 25 e 100 ng/L. (vedi ripetibilità stretta PFAS-ASTM-scarichi.xls reperibile nella directory : UF CH Acque/validazione acque/parametri statistici/elaborazioni varie prove accreditate/LC-MS-PFAS- ASTM) Le prove sperimentali per il calcolo del limite di ripetibilità sono state eseguite in data 23- 4-2018 su campione fortificato
25 ng/L	100 ng/L																																																							
PFBA: $r \leq 9.5$	$r \leq 35$																																																							
PFPeA: $r \leq 5.6$	$r \leq 27$																																																							
PFBS: $r \leq 11.0$	$r \leq 39$																																																							
PFHxA: $r \leq 4.8$	$r \leq 45$																																																							
PFHpA: $r \leq 5.8$	$r \leq 24$																																																							
PFHxS: $r \leq 9.6$	$r \leq 41$																																																							
PFOA: $r \leq 6.0$	$r \leq 15$																																																							
PFNA: $r \leq 9.2$	$r \leq 18$																																																							
PFDA: $r \leq 11$	$r \leq 18$																																																							
PFOS: $r \leq 8.0$	$r \leq 39$																																																							
PFUnA: $r \leq 6.1$	$r \leq 23$																																																							
PFDoA: $r \leq 7.3$	$r \leq 22$																																																							
80 ng/L ca.	Limite																																																							
PFBA: 68-75=7	25																																																							
PFPeA: 74-82=8	30																																																							
PFBS: 88-78=10	29																																																							
PFHxA: 82-85=3	35																																																							
PFHpA: 77-81=4	31																																																							
PFHxS: 91-65=26	28																																																							
PFOA: 77-89=12	15																																																							
PFNA: 74-85=11	16																																																							
PFDA: 77-91=14	19																																																							
PFOS: 70-76=6	36																																																							
PFUnA: 71-83=12	20																																																							
PFDoA: 77-85=8	19																																																							
Recupero/Esattezza	70 % ÷ 130 %	Vedi dati dei recuperi % riportati in All. 2	P																																																					

⁽¹⁾ P = Positivo, N = Negativo

⁽²⁾ Inserire il percorso per eventuali collegamenti ipertestuali

2.2 Calcolo dell'incertezza di misura

Il metodo di riferimento non riporta dati di riproducibilità. Per tutti gli analiti l'incertezza di misura estesa viene calcolata adottando l'equazione di Horwitz corretta Thompson pari al 44% a tutti i livelli di concentrazione.

2.3 Espressione del risultato

Campo di misura		Cifre Decimali	Incertezza estesa % (k =2)	Unità di misura
PFBA	25 ÷ 800	0	x ± 44% x	ng/L
PFPeA	25 ÷ 800	0	x ± 44% x	ng/L
PFBS	25 ÷ 800	0	x ± 44% x	ng/L
PFHxA	25 ÷ 800	0	x ± 44% x	ng/L
PFHpA	25 ÷ 800	0	x ± 44% x	ng/L
PFHxS	25 ÷ 800	0	x ± 44% x	ng/L
PFOA	25 ÷ 800	0	x ± 44% x	ng/L
PFNA	25 ÷ 800	0	x ± 44% x	ng/L
PFDA	25 ÷ 800	0	x ± 44% x	ng/L
PFOS	25 ÷ 800	0	x ± 44% x	ng/L
PFUnA	25 ÷ 800	0	x ± 44% x	ng/L
PFDoA	25 ÷ 800	0	x ± 44% x	ng/L

2.4 Quantificazione delle risorse umane (gg persona) e materiali impiegati

E' stato confermato l'impiego di risorse preventivate nel progetto di validazione.

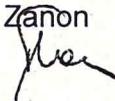
2.5 Giudizio di idoneità all'uso

Visti i risultati sperimentali della validazione, si esprime il seguente giudizio di idoneità della procedura di prova all'utilizzo previsto, a fronte dello scopo e del campo di applicazione previsti e dei criteri di accettabilità predefiniti: X IDONEO NON IDONEO

Data: 03/05/2018

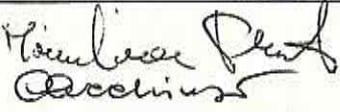
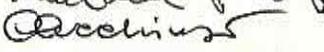
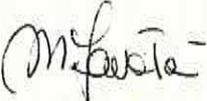
RDU / Dirigente PAS

F. Zanon



Annex IV

SOP for the analysis of wastewater

ARPA Veneto 	PROCEDURA DI PROVA	MW089.0CVE Pagina n. 1 di 10 Rev. n. 0 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI DI ACQUE DI SCARICO MEDIANTE LC MS		
TDU M. Prenzato TDU C. Cecchinato	AQ M. Favatà	PAS F. Zanon
 		
REDAZIONE	VERIFICA	APPROVAZIONE

SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS*) IN CAMPIONI DI ACQUE DI SCARICO MEDIANTE LC MS

1. SCOPO E CAMPO D'APPLICAZIONE

Il metodo consente di determinare la concentrazione di nove acidi perfluoroalchilcarbossilici (da 4 a 12 atomi di carbonio) e tre perfluoroalchilsolfonici (4, 6 e 8 atomi di carbonio) in campioni di acque di scarico.

*PFPeA, PFPBA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFBS, PFHxS, PFOS

2.1 Basi scientifiche

Il metodo è basato sulla determinazione simultanea delle sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) sopra citate mediante analisi in LC MS triplo quadrupolo con ionizzazione elettronegativa -ESI e rilevazione in modalità Multiple Reaction Monitoring (MRM). I campioni di acque di scarico vengono analizzati per iniezione diretta previa diluizione al 50% di MeOH e filtrati a 0.2 µm con l'aggiunta di opportuni standard interni marcati (e opportunamente diluiti).

2.2 Intervallo di applicazione

I composti analizzati vengono riportati nella tabella A1 e il range di misura va da 20 a 800 ng/L per tutti gli analiti. Concentrazioni al di fuori di questo intervallo possono essere determinate previa diluizione.

2.3 Limite di quantificazione

Per tutti gli analiti il limite di quantificazione è pari a 25 ng/L.

3. INTERFERENZE E CAUSE D'ERRORE

I composti PFAS entrano nella composizione di diversi polimeri fluorurati potenzialmente presenti anche nel sistema analitico impiegato nel corso della presente procedura, rilasciati ad esempio da parti che compongono la strumentazione cromatografica (sistema di degasaggio in linea, guarnizioni etc.). Se possibile, sostituire le parti fluorurate con altre di diverso materiale oppure aggirarle. Se necessario, aggiungere in linea una precolonna C18 a monte dell'iniettore per ritardare l'uscita dei contaminanti.

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW089.0CVE Pagina n. 2 di 10 Rev. n. 0 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI DI ACQUE DI SCARICO MEDIANTE LC MS		

Per evitare il più possibile le contaminazioni è buona norma sciacquare rigorosamente prima dell'uso con diclorometano e metanolo tutta l'attrezzatura che entra in contatto con il campione.

Interferenze positive o negative possono essere causate anche dal tipo di contenitore in cui viene posto il campione al momento del prelievo (es. sottotappi in teflon danno interferenza positiva mentre il vetro può rappresentare un punto di adsorbimento degli analiti ricercati) e per evitare ciò vengono impiegate bottiglie in polipropilene lavate senza utilizzo di detersivi.

4. RIFERIMENTI

ASTM D7979-17

5. APPARECCHIATURA E ATTREZZATURE

5.1 Apparecchiature

5.1.1 HPLC LC-30AD XR Shimadzu abbinato all'autocampionatore CTC PAL HTS XT e interfacciato allo spettrometro di massa API 6500 AB Sciex triplo quadrupolo CAP725

5.1.2 Sistema di acquisizione dati ed integrazione Analyst TM 1.6.3 abbinato a MULTIQUNANT 3.02

5.1.3 Centrifuga sottovuoto

5.2 Attrezzature

5.2.1 Colonna cromatografica Ascentis RP-Amide 15 cm X 2.1 mm 2.7 µm o colonne C18

5.2.2 Provette da 10 mL in polipropilene

5.2.3 Vials da 2 mL in polipropilene

5.2.4 Micropipette a volume variabile tarate da 20 µL a 5000 µL

5.2.5 Filtri in acetato di cellulosa rigenerata 0.2 µm

5.2.6 Provette da 50 mL in polipropilene (falcon)

5.2.7 Siringhe da 10 o 20 mL

6. REATTIVI E STANDARD

6.1 Reattivi

6.1.1 acqua ultrapura per LC MS

6.1.2 metanolo per LC MS

6.1.3 diclorometano

6.1.4 soluzione acquosa di ammoniaca 30-33% PA

6.1.5 Fase mobile A: acqua ultrapura 25mM acetato di ammonio al 5% di MeOH

6.1.6 Fase mobile B: MeOH LC-MS-ACN LC-MS 2:8

6.1.7 Sodio Tiosolfato pentaidrato soluzione al 10%

6.1.8 Acido acetico

6.1.9 Ammonio acetato

6.1.10 Acetonitrile LC-MS (ACN)

6.1.11 Acido acetico 10%

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW089.0CVE
		Pagina n. 3 di 10 Rev. n. 0 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI DI ACQUE DI SCARICO MEDIANTE LC MS		

6.2 Standard

6.2.1 Standard soluzioni madre a 5 mg/L e Mix a 2 mg/L

A partire dalle soluzioni certificate riportate nella seguente tabella A1, si preleva 1 mL di ciascun composto e si diluisce con metanolo di cui al punto 6.1.2 in matraccio da 10 mL, ottenendo le soluzioni singole a 5 mg/L certificate degli standard nativi e marcati.

Le soluzioni a 5 mg/L così ottenute vengono aliquotate in vials da 2 mL in polipropilene e conservate a 4°C al buio.

Le soluzioni così ottenute vengono diluite come riportato al punto 6.2.2.

Tabella A1
Preparazione delle soluzioni standard di PFAS a 5 mg/L

STD Nativi					
		mL	µg/mL		
	soluzioni metanoliche di:	Quantità	Conc	peso molecolare	N° CAS
PFBA	Perfluoro-n-butanoic acid	1.2	50	214	375-22-4
PFPeA	Perfluoro-n-pentanoic acid	1.2	50	264	2706-90-3
PFHxA	Perfluoro-n-hexanoic acid	1.2	50	314	307-24-4
PFHpA	Perfluoro-n-heptanoic acid	1.2	50	364	375-85-9
PFOA	Perfluoro-n-octanoic acid	1.2	50	414	335-67-1
PFNA	Perfluoro-n-nonanoic acid	1.2	50	464	375-91-1
PFDA	Perfluoro-n-decanoic acid	1.2	50	514	335-76-2
PFUdA	Perfluoro-n-undecanoic acid	1.2	50	564	2058-94-8
PFDoA	Perfluoro-n-dodecanoic acid	1.2	50	614	307-55-1
L-PFBS	Potassium perfluoro-1-butanefulfonate	1.2	50	300	375-73-5
L-PFHxS	Sodium perfluoro-1-hexanesulfonate	1.2	50	400	355-46-4
L-PFOS	Sodium perfluoro-1-octanesulfonate	1.2	50	500	1763-23-1
STD interni marcati					
		mL	µg/mL		
	soluzioni metanoliche di:	Quantità	Conc	peso molecolare	
MPFBA	Perfluoro-n-[¹³ C ₄]butanoic acid	1.2	50	218.01	n.d.
M3PFPeA	Perfluoro-n-[3,4,5- ¹³ C ₃]Pentanoic acid	1.2	50	267.02	n.d.
MPFHxA	Perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]Hexanoic acid	1.2	50	316.04	n.d.
MPFOA	Perfluoro-n-[1,2,3,4- ¹³ C ₄]Octanoic acid	1.2	50	418.04	n.d.
MPFNA	Perfluoro-n-[1,2,3,4,5- ¹³ C ₅]Nonanoic acid	1.2	50	469.04	n.d.
MPFDA	Perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]decanoic acid	1.2	50	516.07	n.d.
MPFUdA	Perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]undecanoic acid	1.2	50	566.08	n.d.
MPFDoA	Perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]dodecanoic acid	1.2	50	616.08	n.d.
MPFHxS	Sodium perfluoro-1-hexane[¹⁸ O ₂]sulfonate	1.2	50	426.1	n.d.
MPFOS	Sodium perfluoro-1-[1,2,3,4- ¹³ C ₄]octanesulfonate	1.2	50	526.08	n.d.

In alternativa agli standard singoli può essere acquistata una miscela di standard nativi certificata già pronta avente la composizione riportata nella tabella A2. Tale miscela viene diluita seguendo le indicazioni riportate al punto 6.2.2.

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW089.0CVE Pagina n. 4 di 10 Rev. n. 0 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI DI ACQUE DI SCARICO MEDIANTE LC MS		

Tabella A2

Preparazione delle soluzioni standard di PFAS a 2 mg/L

Miscela di STD nativi (mix)			
Soluzioni in acetone		Quantità mL	Conc mg/L
PFBA	Perfluoro-n-butanoic acid	1.2	2
PFPeA	Perfluoro-n-pentanoic acid	1.2	2
PFHxA	Perfluoro-n-hexanoic acid	1.2	2
PFHpA	Perfluoro-n-eptanoic acid	1.2	2
PFOA	Perfluoro-n-octanoic acid	1.2	2
PFNA	Perfluoro-n-nonanoic acid	1.2	2
PFDA	Perfluoro-n-decanoic acid	1.2	2
PFUnDA	Perfluoro-n-undecanoic acid	1.2	2
PFDODA	Perfluoro-n-dodecanoic acid	1.2	2
PFBS	Potassium Perfluoro-1-butane sulfonate	1.2	1.77
PFHxS	Sodium Perfluoro-1-hexane sulfonate	1.2	1.89
PFOS	Sodium Perfluoro-1-octane sulfonate	1.2	1.91

6.2.2 Soluzioni mix intermedie a 100 µg/L di standard nativi

Partendo dalle soluzioni madre singole a 5 mg/L o dal mix a 2 mg/L di cui al punto 6.2.1, si prepara una soluzione mix degli standard nativi a 100 µg/L in metanolo 6.1.2. Le soluzioni così ottenute vengono aliquotate in vials da 2 mL in polipropilene e conservate a 4°C al buio.

6.2.3 Soluzioni mix intermedie a 100 µg/L di standard interni marcati

Partendo dalle soluzioni madre a 5 mg/L di standard marcati, si prepara una soluzione mix in metanolo a 100 µg/L. Le soluzioni così ottenute vengono aliquotate in vials da 2 mL in polipropilene e conservate a 4°C al buio.

6.2.4 Soluzioni standard mix intermedie a 5000 ng/L

Prelevare 125 µL della soluzione a 100 µg/L degli standard mix nativi (6.2.2) e diluirla con MeOH (6.1.2) in 2.5mL finali. La soluzione viene utilizzata per preparare la serie di standard a diverso livello di concentrazione per curve di taratura e ha una scadenza giornaliera.

6.2.5 Soluzioni standard mix

Preparare la curva di taratura secondo la Tabella B.

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW089.0CVE
		Pagina n. 5 di 10 Rev. n. 0 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI DI ACQUE DI SCARICO MEDIANTE LC MS		

Tabella B*
Preparazione delle soluzioni standard di taratura

STD Taratura	volume (µL) STD 6.2.4 a 5000 ng/L	Conc. finale STD nativi ng/L	volume (µL) MeOH (6.1.2)	volume (µL) IS 5000 ng/L (6.2.8)	volume (µL) MilliQ (6.1.1)	volume finale (mL)
Bianco	0	0	4900	100	5000	10.00
STD 20	20	20	4880	100	5000	10.00
STD 100	100	100	4800	100	5000	10.00
STD 200	200	200	4700	100	5000	10.00
STD 400	400	400	4500	100	5000	10.00
STD 800	800	800	4100	100	5000	10.00

*NB: la concentrazione è riferita a 5 mL di soluzione (quella reale iniettata nella LC-MS è pari ad un quarto di quella riportata in tabella in quanto viene effettuata una diluizione 1:4 come spiegato nel § 8).

La concentrazione dello STD interno riferita ai 5 mL è di 100 ng/L (quella reale iniettata nella LC-MS è di 25 ng/L)

6.2.6 Soluzioni concentrate di 8000 ng/L e 800 ng/L per Spike e carte di controllo

6.2.6.1

La soluzione a 8000 ng/L viene preparata diluendo 400 µL di mix nativi a 100 µg/L (6.2.2) in 5 mL di metanolo (6.1.2)

Viene successivamente aliquotato in 3 vials da 2 mL. Tale soluzione è stabile per 2 mesi.

6.2.6.2 Mix intermedio 800 ng/L

Prelevare 50 µL dalla soluzione a 8000 ng/L (6.2.6.1) e diluirla con metanolo in vial a 0.5 mL finali. Tale soluzione viene preparata ad ogni sessione analitica

6.2.7 Soluzioni per carte di controllo 40 ng/L e 400 ng/L

Preparare le soluzioni per le carte di controllo seguendo la tabella C

Tabella C*
Preparazione delle soluzioni per carte di controllo

	volume (µL) CC 8000 (6.2.6.1) ng/L	volume (µL) CC 800 (6.2.6) ng/L	Conc. STD nativi µg/L	volume (µL) MeOH (6.1.2)	volume (µL) MilliQ (6.1.1)	volume (µL) IS 5000 ng/L (6.2.8)	volume finale (mL)
Carta di Controllo (CC) 2.5%	-----	250	40	4650	5000	100	10
Carta di Controllo (CC) 25%	250	-----	400	4650	5000	100	10

*NB: la concentrazione è riferita a 5 mL di soluzione (quella reale iniettata nella LC-MS è pari ad un quarto di quella riportata in tabella in quanto viene effettuata una diluizione 1:4 come spiegato nel § 8).

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW089.0CVE Pagina n. 6 di 10 Rev. n. 0 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI DI ACQUE DI SCARICO MEDIANTE LC MS		

6.2.8 Soluzione Standard interno 5000 ng/L

Prelevare 500 µL di STD interno mix intermedio IS a 100 ppb (6.2.3) e diluirlo a 10 mL con metanolo (6.1.2).

7. CONSERVAZIONE E PRETRATTAMENTO DEL CAMPIONE

I campioni vengono conservati tra 0 e 6°C al buio ed analizzati entro 28 giorni.

8. PROCEDIMENTO

5 mL di campione (o MilliQ per il Bianco di processo) viene prelevato (dopo accurata omogeneizzazione) e trasferito in una provetta da 10 mL in polipropilene (5.2.2) precedentemente addizionata con 100 µL di standard interno (6.2.8) a 5000 ng/L (100 ng/L conc. finale). Vengono addizionati 4.9 mL di Metanolo (6.1.2) e omogeneizzato in vortex per circa 2 minuti. Il campione viene filtrato con filtri in acetato di cellulosa rigenerata 0.2 µm precedentemente lavati con 10 mL di Metanolo.

A questo punto si prelevano 500 µL di filtrato (di STD, vedi punto 6.2.6, di Carta di controllo, vedi punto 6.2.7) e si trasferisce in vial in polipropilene da 1.8 mL e si addizionano 500 µL di MilliQ 6.1.1 allo 0.8% di acido acetico

8.1 Condizioni strumentali del sistema LC MS

Di seguito sono elencate le condizioni strumentali concernenti il sistema cromatografico e lo spettrometro di massa.

8.1.1 Condizioni cromatografiche

8.1.1.1 Flusso 0.3 mL /min (con Ascentis)

8.1.1.2 Volume di iniezione 80 µL

8.1.1.3 Termostatazione della colonna a 40 °C

8.1.1.4 Gradiente: la fase mobile è costituita dalle soluzioni A (acqua ultrapura 2mM acetato di ammonio) e B (MeOH-ACN 2-8) di cui ai punti 6.1.8 e 6.1.9 ed è composta come descritto nella Tabella D che segue:

**Tabella D
Composizione del gradiente HPLC**

Tempo (min)	%	%B
0.2	100	0
1.0	60	20
16.0	0	100
18.0	0	100
19.0	100	0
20.0	100	0

8.1.2 Impostazioni dello spettrometro di massa

Nelle Tabelle E ed F sono descritte le impostazioni dello spettrometro di massa:

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW089.0CVE Pagina n. 7 di 10 Rev. n. 0 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI DI ACQUE DI SCARICO MEDIANTE LC MS		

**Tabella E
Parametri della sorgente di ionizzazione**

Sorgente di ionizzazione	ESI Spray voltage: -4500V Temperatura in sorgente: 350°C Ion source turbo spray: Curtain gas: 25 psig Ion source gas 1: 36 psig Ion source gas 2: 50 psig
Condizioni di ionizzazione	Ionizzazione negativa
Modalità di acquisizione degli ioni	Multiple reaction monitoring (MRM) come in Tabella F
Gas di collisione	Azoto
Pressione del gas di collisione	9 L/min

**Tabella F
Parametri spettrometro di massa**

	Q1 mass	Q3 mass	DP (Volts)	EP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
PFBA	212.9	168.9	-11	-10	-12	-10
PFPeA	262.9	218.7	-11	-10	-11	-10
PFHxA_1	312.9	119.1	-11	-10	-12	-10
PFHxA_2	312.9	268.9	-11	-10	-28	-10
PFHpA_1	362.9	169	-11	-10	-15	-10
PFHpA_2	362.9	318.9	-10	-10	-20	-10
PFOA_1	412.9	169	-35	-10	-15	-10
PFOA_2	412.9	368.9	-35	-10	-20	-10
PFNA_1	462.9	218.9	-20	-10	-14	-10
PFNA_2	462.9	418.9	-20	-10	-23	-10
PFDA_1	512.9	268.9	-20	-10	-17	-10
PFDA_2	512.9	468.9	-20	-10	-25	-10
PFUnDA_1	562.9	268.8	-20	-10	-17	-10
PFUnDA_2	562.9	518.8	-20	-10	-27	-10
PFDoDA_1	612.9	318.8	-24	-10	-20	-15
PFDoDA_2	612.9	569.9	-24	-10	-28	-15
PFBS_1	298.9	80.2	-61	-10	-64	-10
PFBS_2	298.9	99.1	-61	-10	-36	-10
PFHxS_1	398.9	80.1	-70	-10	-85	-15
PFHxS_2	398.9	99	-70	-10	-80	-15
PFOS_1	498.9	80	-85	-8	-108	-10
PFOS_2	498.9	99.1	-85	10	-96	-10
MPFBA	216.9	171.9	-15	-10	-14	-12
MPFHxA	314.9	269.9	-20	-10	-13	-9
MPFOA	416.9	371.9	-20	-10	-15	-9
MPFNA	467.9	422.9	-20	-8	-15	-10
MPFDA	514.9	469.9	-20	-15	-15	-10
MPFUnDA	564.9	519.8	-15	-15	-18	-10
MPFDoDA	614.9	569.9	-30	-10	-20	-30
MPFHxS	402.9	103	-10	-15	-44	-6
MPFOS	502.9	99.1	-85	-9	-95	-6
MPFPeA	266	222	-10	-8	-11	-6

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW089.0CVE Pagina n. 8 di 10 Rev. n. 0 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI DI ACQUE DI SCARICO MEDIANTE LC MS		

8.2 Bianco di processo

Preparare in doppio il bianco utilizzando l'acqua MilliQ (6.1.1) con cui vengono effettuate le diluizioni degli standard come campione.

8.3 Recupero

8.3.1 recupero a 80 ng/L

Per la valutazione del recupero si utilizza un campione reale fortificato ottenuto aggiungendo 50 µL di soluzione 6.2.6.1 (8000 ng/L) in 5 mL di campione reale e poi procedendo come al punto 8.

NB: la concentrazione nei 5 mL è pari a 80 ng/L e dopo diluizione 1:4 la concentrazione effettiva è pari a 20 ng/L

8.3.2 recupero a 20 ng/L

Per la valutazione del recupero si utilizza un campione reale fortificato ottenuto aggiungendo 125 µL di soluzione 6.2.6.2 (800 ng/L) in 5 mL di campione reale e poi procedendo come al punto 8.

NB: la concentrazione nei 5 mL è pari a 20 ng/L e dopo diluizione 1:4 la concentrazione effettiva è pari a 5 ng/L

9. TARATURA

Si utilizzano gli Standard multicomponenti di cui alla Tabella B per calcolare le curve di taratura su 4 livelli di concentrazione (più un bianco), impiegando il metodo dello standard interno. Le tarature così effettuate individuano un range di concentrazione effettiva nel campione che va da 10 a 200 ng/L.

9.1 Taratura e preparazione della sequenza di campioni da analizzare (batch d'analisi)

Il batch d'analisi viene preparato mettendo in successione il bianco, gli standard (5 livelli), le soluzioni delle carte di controllo (40 ng/L e 400 ng/L) e i campioni seguendo lo schema di seguito riportato:

Bianco, STD20, STD100, STD200, STD400, STD800. CC 40 ng/L CC 400 ng/L Campione1, Campione2... Campione 30 (l'intera sequenza non deve superare le 24 ore complessive di durata). Nella sequenza vanno inseriti almeno 2 soluzioni Spike 80 ng/L per calcolare il limite di ripetibilità (vedi paragrafo 8.3).

Al termine della sequenza si riproccesseranno 2 STD uno a bassa concentrazione (es. STD10, STD25) e uno ad alta concentrazione (es. STD100 STD200) che dovranno rientrare nel 30% di tolleranza per ritenere valida la sequenza.

10. CALCOLI ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Prima di procedere alla stima della concentrazione è necessario verificare la corretta identificazione dell'analita in esame controllando che vengano rispettate le seguenti condizioni:

- 1) il rapporto tra le transizioni (ove possibili) non deve mai superare il $\pm 30\%$ della media del rapporto di transizione degli std di taratura per PFOA e PFOS.

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW089.0CVE Pagina n. 9 di 10 Rev. n. 0 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI DI ACQUE DI SCARICO MEDIANTE LC MS		

- 2) il rapporto tra tempo di ritenzione dell'analita e quello dello std interno (RT relativo) non deve mai superare $\pm 0.5\%$ la media del rapporto di transizione degli std di taratura per PFOA e PFOS. Per gli altri analiti lo scostamento massimo dalla media non deve superare il $\pm 1\%$. Nel caso di taratura con standard esterno il metodo ASTM stabilisce come criterio di accettabilità uno scostamento del 5% del RT dell'analita da quello dello standard centrale della curva.

10.1 Calcoli

Le concentrazioni degli analiti si ricavano dalla curva di taratura costruita per ciascun composto.

Nel caso la concentrazione di un campione risulti superare il limite massimo del range di cui al punto 9, il campione viene diluito opportunamente prelevando un volume inferiore ai 5 mL previsti e riprocessato come indicato nel paragrafo 8.

Il risultato viene fornito direttamente dal report strumentale in ng/L, tenendo in considerazione eventuali diluizioni.

I risultati vengono espressi senza cifre decimali.

11. PARAMETRI STATISTICI

11.1 Criteri accettabilità della curva di taratura

La taratura viene effettuata in ogni sessione d'analisi valutando il coefficiente di correlazione che deve essere $r > 0.990$ ($r^2 > 0.98$ metodo ASTM) inoltre le due carte di controllo devono rispettare i criteri di cui al paragrafo 11.4.

11.2 Recupero

Il recupero a 80 ng/L (vedi punto 8.3.1) è ritenuto valido se compreso tra il 70% e il 130% per tutti gli analiti.

Il recupero a 20 ng/L (vedi punto 8.3.2) è ritenuto valido se compreso tra il 35% e il 150% per tutti gli analiti.

11.3 Carte di controllo

Il processo analitico viene tenuto sotto controllo mediante carte di controllo sulle sostanze perfluoroalchiliche più significative: PFBA, PFBS, PFOA, PFOS.

Le carte di controllo (CC) vengono effettuate analizzando dei materiali di riferimento a due livelli di concentrazione, uno prossimo al LOQ (40 ng/L) e uno all'50% (400 ng/L) del range di taratura (vedi punto 6.2.7).

I valori delle C.C. vengono valutati secondo quanto previsto dalla PG07DL "Carte di controllo". Nel caso in cui uno o più valori della carta di controllo superino i limiti di controllo, ma risultino essere all'interno dell'intervallo d'incertezza, i risultati vengono considerati validi.

Nel caso in cui uno o più valori della carta di controllo non rientrino all'interno dell'intervallo d'incertezza si valuterà la possibilità di accettare o meno i risultati del batch analitico.

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MW089.0CVE Pagina n. 10 di 10 Rev. n. 0 del 26/03/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN CAMPIONI DI ACQUE DI SCARICO MEDIANTE LC MS		

11.4 STD di controllo batch

Si procede analizzando i 5 livelli della curva di taratura e il bianco. Vengono aggiunte le carte di controllo e il recupero a 80 ng/L e il recupero a 20 ng/L, 2 bianchi processo. Dopo 30 campioni analizzati o alla fine della sequenza d'analisi (punto 9.1) si rileggono uno STD basso ed uno alto assegnando la funzione quality control. Se i valori rientrano nel 30% del valore teorico le condizioni strumentali vengono ritenute costanti nel tempo dell'analisi.

11.5 Incertezza di misura

È stata calcolata secondo quanto previsto dalla PG37DL "Valutazione e controllo dell'incertezza di misura per prove chimiche e fisiche" seguendo le modalità indicate nel progetto di validazione. I risultati ottenuti sono riassunti nel rapporto di validazione.

11.6 Partecipazione a ring test

Il laboratorio partecipa al proficiency test AQUACHECK AQ-26, i risultati sono raccolti nel quaderno dei ring test.

12. NORMATIVA

La normativa di riferimento si trova in intranet al seguente indirizzo:

[http://intranet/ Documenti / Dipartimento Regionale Laboratori / Qualità / DL / 04 - DOCUMENTI DI ORIGINE ESTERNA / Metodi di Prova e Documenti legislativi correlati](http://intranet/Documenti/Dipartimento Regionale Laboratori/Qualità/DL/04-DOCUMENTI DI ORIGINE ESTERNA/ Metodi di Prova e Documenti legislativi correlati)

13. BIBLIOGRAFIA

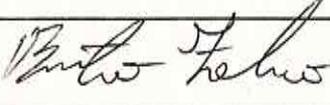
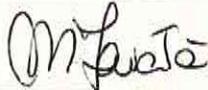
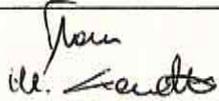
USEPA (2009) Method 537. Determination of Selected Perfluorinated Alkyl Acid in Drinking Water by Solid Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS) Version 1.1 Document EPA/600/R-08/092, September 2009

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"

Notiziario IRSA anno 2013 volume 1

Annex V

SOP for the analysis of soil

ARPA Veneto 	PROCEDURA DI PROVA	MR051.0CVE Pagina n. 1 di 10 Rev. n. 0 del 20/09/2018
SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN SEDIMENTI, FANGHI, TERRENI E RIFIUTI		
AT F. Biancato*	AQ M. Favatà	RS M. Gerotto e F. Zanon
		
REDAZIONE	VERIFICA	APPROVAZIONE

* in collaborazione con C. Cecchinato e M. Prenzato

SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN SEDIMENTI, FANGHI, TERRENI E RIFIUTI

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo consente la determinazione delle sostanze perfluoroalchiliche (PFAS), più precisamente di nove acidi perfluoroalchilcarbossilici (da 4 a 12 atomi di carbonio), tre acidi perfluoroalchilsolfonici (4, 6 e 8 atomi di carbonio) in campioni di sedimenti, fanghi, terreni e rifiuti: PFPeA, PFPBA, PFHxA PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFBS, PFHxS, PFOS.

2. PRINCIPIO DEL METODO

2.1 Basi scientifiche

Il metodo si basa sull'estrazione delle sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) sopra citate, partendo dal campione essiccato (preparato secondo IO24CVE) o tal quale, mediante agitazione con MeOH e acqua (50:50) in ambiente basico, successiva centrifugazione per separare la fase liquida dalla fase solida e conclusiva filtrazione della porzione liquida seguita dall'acidificazione del campione. I campioni estratti vengono quindi analizzati mediante analisi in LC-MS triplo quadrupolo con ionizzazione elettronegativa -ESI e rilevazione in modalità Multiple Reaction Monitoring (MRM), per iniezione diretta previa diluizione (minimo 1:100) e aggiunta di opportuni standard interni marcati. Nel caso di matrici particolarmente complesse o sporche come fanghi e rifiuti, l'analisi in LC MS MS è preceduta da uno stadio di purificazione su SPE, similmente a quanto descritto nella procedura di prova MW082.0CVE punto 8.1.

2.2 Intervallo di applicazione

I composti analizzati sono riportati nella tabella A1 di cui al paragrafo 6.2.1.
Il range di misura nelle condizioni standard di applicazione del metodo (2 g di campione, 10 mL di estratto, fattore diluizione 100) va da 0.003 a 0.1 mg/Kg per tutti gli analiti.

2.3 Limite di quantificazione

I limiti di quantificazione, che dipendono dall'obiettivo dell'analisi e dalla tipologia della matrice, sono rispettivamente:

- per la determinazione dei livelli di fondo: 0.003 mg/kg;
- per terreni da siti residenziali (D.Lgs 152/Col. A) e sedimenti: 0.010 mg/kg;
- per terreni da siti industriali (D.Lgs 152/Col. B) e fanghi per utilizzo agronomico: 0.050 mg/kg;
- per rifiuti: 0.1 mg/kg;

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MR051.0CVE Pagina n. 2 di 10 Rev. n. 0 del 20/09/2018
ESTRAZIONE DELLE SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN SEDIMENTI, FANGHI, TERRENI E RIFIUTI		

3. INTERFERENZE E CAUSE D'ERRORE

Per evitare il più possibile le contaminazioni, soprattutto in fase di estrazione, è buona norma usare recipienti in polipropilene (o usa e getta) evitando assolutamente l'uso di contenitori e sottotappi in teflon o di ancorette magnetiche (danno interferenza positiva); inoltre tutta la vetreria necessaria viene trattata con diclorometano e metanolo prima dell'uso (il vetro può rappresentare un punto di adsorbimento degli analiti ricercati).

Ulteriori contaminazioni possono essere date dal setto in teflon presente nei tappi della vials, il quale viene preventivamente rimosso prima dell'uso.

4. RIFERIMENTI

ASTM D7968 – 17a Standard Test Method for Determination of Polfluorinated Compounds in Soil by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS).

5. APPARECCHIATURE E ATTREZZATURE

5.1 Apparecchiature

- 5.1.1 Stufa ventilata a 40°C/105°C
- 5.1.2 Mulino frantumatore
- 5.1.3 Vortex
- 5.1.4 Centrifuga Thermo Multifughe 3S+
- 5.1.5 Bilancia analitica (± 0.001 g)
- 5.1.6 Agitatore a capovolgimento automatico
- 5.1.7 HPLC LC-30AD XR Shimadzu abbinato all'autocampionatore CTC PAL HTS XT e interfacciato allo spettrometro di massa API 6500 AB Sciex triplo quadrupolo CAP725
- 5.1.8 Sistema di acquisizione dati ed integrazione Analyst TM 1.6.3 abbinato a MULTIQUANT 3.02

5.2 Attrezzature

- 5.2.1 Provette in polipropilene da 10 mL
- 5.2.2 Vials in polipropilene da 2 mL
- 5.2.3 Vetreria lavata con Diclorometano PA e Metanolo per LCMS
- 5.2.4 Provettoni Falcon da 50 mL in polipropilene
- 5.2.5 Siringhe in polipropilene (condizionate con Metanolo per LCMS)
- 5.2.6 Filtri in acetato di cellulosa rigenerata porosità pari a 20 μ m (condizionati con Metanolo)
- 5.2.7 Micropipette a volume variabile tarate da 50 μ L a 5000 μ L
- 5.2.8 Cartine al tornasole per controllo pH
- 5.2.9 Colonna cromatografica Ascentis RP-Amide 15 cm X 2.1 mm 2.7 μ m o colonne C18
- 5.2.10 Vials da 2 mL in polipropilene

6. REATTIVI E STANDARD

6.1 Reattivi

- 6.1.1 Acqua ultrapura per LC MS
- 6.1.2 Metanolo per LC MS

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MR051.0CVE Pagina n. 3 di 10 Rev. n. 0 del 20/09/2018
ESTRAZIONE DELLE SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN SEDIMENTI, FANGHI, TERRENI E RIFIUTI		

- 6.1.3 Diclorometano PA
6.1.4 Soluzione di MeOH (6.1.2):H₂O (50:50)
6.1.5 Soluzione acquosa di ammoniaca 30-33 % PA
6.1.6 Soluzione acquosa di ammoniaca 6 % ca. (soluzione 6.1.5 diluita 1:5)
6.1.7 Acido Acetico Glaciale PA
6.1.8 Acido acetico 10%: diluire 1:10 l'acido acetico di cui al punto 6.1.7
6.1.9 Fase mobile A: acqua ultrapura 25mM acetato di ammonio al 5% di MeOH
6.1.10 Fase mobile B: MeOH LC-MS-ACN LC-MS 2:8
6.1.11 Ammonio acetato
6.1.12 Acetonitrile LC-MS (ACN)
6.1.13 Terreno di riferimento esente da PFAS (di seguito denominato "Mix Validazione PFAS")

6.2 Standard

6.2.1 Standard soluzioni madre a 5 ppm e mix a 2 ppm

A partire dalle soluzioni certificate riportate nella seguente tabella A1, si preleva 1 mL di ciascun composto e si diluisce con metanolo di cui al punto 6.1.2 in matraccio da 10 mL, ottenendo le soluzioni singole a 5 ppm certificate degli standard nativi e marcati. Le soluzioni a 5 ppm così ottenute vengono aliquotate in vials da 2 mL in polipropilene e conservate a 4°C al buio. Tali soluzioni vengono diluite come riportato al punto 6.2.2 e 6.2.3.

Tabella A1

STD Nativi					
		mL	µg/mL		
	soluzioni metanoliche di:	Quantità	Conc	peso molecolare	N° CAS
PFBA	Perfluoro-n-butanoic acid	1.2	50	214	375-22-4
PFPeA	Perfluoro-n-pentanoic acid	1.2	50	284	2706-80-3
PFHxA	Perfluoro-n-hexanoic acid	1.2	50	314	307-24-4
PFHpA	Perfluoro-n-heptanoic acid	1.2	50	364	375-85-9
PFOA	Perfluoro-n-octanoic acid	1.2	50	414	335-67-1
PFNA	Perfluoro-n-nonanoic acid	1.2	50	464	375-91-1
PFDA	Perfluoro-n-decanoic acid	1.2	50	514	335-78-2
PFUdA	Perfluoro-n-undecanoic acid	1.2	50	564	2058-94-8
PFDoA	Perfluoro-n-dodecanoic acid	1.2	50	614	307-55-1
L-PFBS	Potassium perfluoro-1-butanefulfonate	1.2	50	300	375-73-5
L-PFHxS	Sodium perfluoro-1-hexanesulfonate	1.2	50	400	355-46-4
L-PFOS	Sodium perfluoro-1-octanesulfonate	1.2	50	500	1763-23-1
STD Interni marcati					
		mL	µg/mL		
	soluzioni metanoliche di:	Quantità	Conc	peso molecolare	
MPFBA	Perfluoro-n-[¹³ C ₄]butanoic acid	1.2	50	218.01	n.d.
M3PFPeA	Perfluoro-n-[3,4,5- ¹³ C ₃]Pentanoic acid	1.2	50	287.02	n.d.
MPFHxA	Perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]Hexanoic acid	1.2	50	316.04	n.d.
MPFOA	Perfluoro-n-[1,2,3,4- ¹³ C ₄]Octanoic acid	1.2	50	418.04	n.d.
MPFNA	Perfluoro-n-[1,2,3,4,5- ¹³ C ₅]Nonanoic acid	1.2	50	469.04	n.d.
MPFDA	Perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]decanoic acid	1.2	50	516.07	n.d.
MPFUdA	Perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]undecanoic acid	1.2	50	566.08	n.d.
MPFDoA	Perfluoro-n-[1,2- ¹³ C ₂]dodecanoic acid	1.2	50	616.08	n.d.
MPFHxS	Sodium perfluoro-1-hexane[¹⁸ O ₂]sulfonate	1.2	50	426.1	n.d.
MPFOS	Sodium perfluoro-1-[1,2,3,4- ¹³ C ₄]octanesulfonate	1.2	50	526.08	n.d.

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MR051.0CVE Pagina n. 4 di 10 Rev. n. 0 del 20/09/2018
ESTRAZIONE DELLE SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN SEDIMENTI, FANGHI, TERRENI E RIFIUTI		

In alternativa agli standard singoli può essere acquistata una miscela di standard nativi certificata già pronta avente la composizione riportata nella tabella A2. Tale miscela viene diluita seguendo le indicazioni riportate al punto 6.2.2.

Tabella A2

Miscela di STD nativi (mix)			
Soluzioni in acetone		Quantità mL	Conc mg/L
PFBA	Perfluoro-n-butanoic acid	1.2	2
PFPeA	Perfluoro-n-pentanoic acid	1.2	2
PFHxA	Perfluoro-n-hexanoic acid	1.2	2
PFHpA	Perfluoro-n-eptanoic acid	1.2	2
PFOA	Perfluoro-n-octanoic acid	1.2	2
PFNA	Perfluoro-n-nonanoic acid	1.2	2
PFDA	Perfluoro-n-decanoic acid	1.2	2
PFUnDA	Perfluoro-n-undecanoic acid	1.2	2
PFDoDA	Perfluoro-n-dodecanoic acid	1.2	2
PFBS	Potassium Perfluoro-1-butane sulfonate	1.2	1.77
PFHxS	Sodium Perfluoro-1-hexane sulfonate	1.2	1.89
PFOS	Sodium Perfluoro-1-octane sulfonate	1.2	1.91

6.2.2 Soluzioni mix intermedie a 100 µg/L di standard nativi

Partendo dalle soluzioni madre singole a 5 ppm o dal mix a 2 ppm di cui al punto 6.2.1, si prepara una soluzione mix degli standard nativi a 100 µg/L in metanolo 6.1.2. Le soluzioni così ottenute vengono aliquotate in vials da 2 mL in polipropilene (5.2.2) e conservate a 4°C al buio. Generalmente viene usata la soluzione mix da 2 ppm dalla quale verranno prelevati 100 µL per preparare le soluzioni a 100 µg/L in MeOH di standard nativi, in vials da 2 mL.

6.2.3 Soluzioni mix intermedie a 100 µg/L di standard interni marcati

Partendo dalle soluzioni madre a 5 ppm di standard marcati, si prepara una soluzione mix in metanolo a 100 µg/L. Le soluzioni così ottenute vengono aliquotate in vials da 2 mL in polipropilene e conservate a 4°C al buio.

6.2.4 Soluzioni 5000 ng/L mix std nativi

Il mix 5000 ng/L viene preparato diluendo 500 µL della soluzione intermedia di mix nativi a 100 µg/L (6.2.2), in 10 mL di metanolo (6.1.2) e aliquotato in provette in polipropilene da 10 mL (5.2.1).

6.2.5 Soluzione Standard interno SI a 5000 ng/L

Prelevare 500 µL dalla soluzione di STD interno mix intermedio IS a 100 µg/L (6.2.3) e diluirlo a 10 mL con metanolo (6.1.2) in provetta di polipropilene da 10 mL (5.2.1).

6.2.6 Soluzioni standard mix

Preparare la curva di taratura secondo la Tabella B.

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MR051.0CVE Pagina n. 5 di 10 Rev. n. 0 del 20/09/2018
ESTRAZIONE DELLE SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN SEDIMENTI, FANGHI, TERRENI E RIFIUTI		

Tabella B
Preparazione delle soluzioni standard di taratura

STD Taratura	volume (µL) STD 6.2.4 a 5000 ng/L	Conc. finale STD nativi ng/L	volume (µL) MeOH (6.1.2)	volume (µL) IS 5000 ng/L (6.2.5)	volume (µL) MilliQ (6.1.1)	volume finale (mL)
Bianco	0	0	4900	100	5000	10.00
STD 5	20	5	4880	100	5000	10.00
STD 25	100	25	4800	100	5000	10.00
STD 50	200	50	4700	100	5000	10.00
STD 100	400	100	4500	100	5000	10.00
STD 200	800	200	4100	100	5000	10.00

6.2.8 Soluzioni per carte di controllo strumentale a 10 ng/L e 100 ng/L

Preparare le soluzioni per le carte di controllo seguendo la tabella C

Tabella C
Preparazione delle soluzioni per carte di controllo

	volume (µL) CC 8000 (6.2.6.1) ng/L	volume (µL) CC 800 (6.2.6) ng/L	Conc. STD nativi µg/L	volume (µL) MeOH (6.1.2)	volume (µL) MilliQ (6.1.1)	volume (µL) IS 5000 ng/L (6.2.8)	volume finale (mL)
Carta di Controllo (CC) 2.5%	-----	250	10	4650	5000	100	10
Carta di Controllo (CC) 25%	250	-----	100	4650	5000	100	10

7. CONSERVAZIONE E PRETRATTAMENTO DEL CAMPIONE

I campioni vengono pesati in provettoni di polipropilene da 50 mL (5.2.4) ed una volta estratti, vanno conservati in cella frigo a 4°C al buio, in provette di polipropilene da 10 mL (5.2.1) ed analizzati entro 15 giorni. Nel caso in cui non si possano analizzare in questo arco di tempo, i campioni vanno congelati.

8. PROCEDIMENTO

8.1 Pesata del campione

Pesare circa 2 grammi di campione in provettone Falcon (5.2.4). La quantità di campione da pesare deve essere scelta in relazione alla natura, provenienza o potenziale contaminazione del campione.

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MR051.0CVE Pagina n. 6 di 10 Rev. n. 0 del 20/09/2018
ESTRAZIONE DELLE SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN SEDIMENTI, FANGHI, TERRENI E RIFIUTI		

In base alla natura del campione potrà inoltre essere valutata l'opportunità di operare a partire dal campione tal quale, piuttosto che dal campione secco (preparato secondo procedura di prova MR040.CVE).

8.2 Preparazione del terreno con aggiunta (Spiked)

Pesare circa 2 grammi di terreno di riferimento esente da PFAS (6.1.13) in provettone Falcon (5.2.4). Aggiungere 100 µL di Standard Interno 5000 ng/L (6.2.5) e 100 µL di Mix Standard Nativi 5000 ng/L (6.2.4).

8.3 Procedura di estrazione

Aggiungere ad ogni campione 10 mL di Soluzione di MeOH:H₂O (50:50) (6.1.4) ed agitare con Vortex (5.1.3) per circa 1 minuto.

Aggiungere ad ogni aliquota 50 µL di soluzione acquosa di ammoniaca al 6 % (6.1.6) fino a raggiungere un pH di circa 9-10.

Mettere quindi ad agitare per 1 ora in agitatore a capovolgimento (5.1.6) con velocità di circa 20 rpm.

Centrifugare (5.1.4) a 1900 rpm per 10 minuti per separare la fase liquida da quella solida, per rendere più semplice la fase di filtrazione (la velocità di centrifuga può essere aumentata nel caso risulti difficoltosa la separazione tra terreno e surnatante).

Filtrare il surnatante di ogni campione. Le siringhe ed i filtri in acetato di cellulosa (5.2.5 e 5.2.6) prima di essere utilizzati vengono condizionati facendo passare circa 10 mL di MeOH (6.1.2) e successivamente asciugati aspirando ed espellendo l'aria due o tre volte.

Il campione filtrato viene raccolto in provette di polipropilene da 10 mL (5.2.1).

Acidificare i campioni con 50 µL di acido acetico (6.1.7) per raggiungere un pH di circa 3-4, e aggiungere 100 µL di SI a 5000 ng/L (6.2.5). Acidificare anche lo SPIKE con 50 µL di acido acetico (6.1.7)

Diluire i campioni con acqua ultrapura (6.1.1), con una diluizione minima di 1:100 in provette da 10 mL in polipropilene (5.2.1). Nel caso di campioni con concentrazioni di PFAS potenzialmente molto elevate è opportuno procedere inizialmente con una diluizione maggiore. Il fattore di diluizione (F) verrà utilizzato per il calcolo della concentrazione finale (punto 10.1).

Nel caso di matrici particolarmente complesse (campioni "sporchi") il campione potrà essere purificato tramite cartucce SPE OASIS WAX.

Trasferire la soluzione diluita degli estratti dei campioni in Vials da 2 mL in polipropilene (5.2.2), con apposito tappo privato del proprio setto, pronte per l'analisi strumentale.

La soluzione di estrazione del campione di terreno esente da PFAS (6.1.13), addizionato di std come specificato al punto 8.2, viene diluita solo 1:2, direttamente in Vial (5.2.2), prelevandone 500 µL e aggiungendo 500 µL di acqua ultrapura (6.1.1).

8.4 Bianco di processo

Per la valutazione del bianco di processo si utilizza un campione preparato come segue: pesare circa 2 grammi di terreno non contaminato (6.1.13) in provettone Falcon in polipropilene (5.2.4) e addizionarlo di 100 µL di SI a 5000 ng/L (6.2.5). Il campione così preparato verrà analizzato nella stessa maniera dei campioni.

8.5 Recupero

Per la valutazione del recupero si utilizza un campione SPIKED preparato come al punto 8.2.

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MR051.0CVE Pagina n. 7 di 10 Rev. n. 0 del 20/09/2018
ESTRAZIONE DELLE SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN SEDIMENTI, FANGHI, TERRENI E RIFIUTI		

Il campione così fortificato, chiamato SPIKED, verrà trattato nella stessa maniera dei campioni e servirà per calcolare il recupero percentuale.

8.6 Analisi in LC MS MS

8.6.1 Condizioni strumentali del cromatografo liquido

8.6.1.1 Flusso 0.3 mL /min

8.6.1.2 Volume di iniezione 80 µL

8.6.1.3 Termostatazione della colonna a 40 °C

8.6.1.4 Gradiente: la fase mobile è costituita dalle soluzioni A (acqua ultrapura 2mM acetato di ammonio) e B (MeOH-ACN 2-8) di cui ai punti 6.1.8 e 6.1.9 ed è composta come descritto nella Tabella D che segue:

Tabella D
Composizione del gradiente HPLC

Tempo (min)	%	%B
0.2	100	0
1.0	60	20
16.0	0	100
18.0	0	100
19.0	100	0
20.0	100	0

8.6.2 Impostazioni dello spettrometro di massa

Nelle Tabelle E ed F sono descritte le impostazioni dello spettrometro di massa:

Tabella E
Parametri della sorgente di ionizzazione

Sorgente di ionizzazione	ESI Spray voltage: -4500V Temperatura in sorgente: 350°C Ion source turbo spray: Curtain gas: 25 psig Ion source gas 1: 36 psig Ion source gas 2: 50 psig
Condizioni di ionizzazione	Ionizzazione negativa
Modalità di acquisizione degli ioni	Multiple reaction monitoring (MRM) come in Tabella F
Gas di collisione	Azoto
Pressione del gas di collisione	9 L/min

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MR051.0CVE Pagina n. 8 di 10 Rev. n. 0 del 20/09/2018
ESTRAZIONE DELLE SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN SEDIMENTI, FANGHI, TERRENI E RIFIUTI		

Tabella F
Parametri spettrometro di massa

	Q1 mass	Q3 mass	DP (Volts)	EP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
PFBA	212.9	168.9	-11	-10	-12	-10
PFPeA	262.9	218.7	-11	-10	-11	-10
PFHxA_1	312.9	119.1	-11	-10	-12	-10
PFHxA_2	312.9	268.9	-11	-10	-28	-10
PFHpA_1	362.9	169	-11	-10	-15	-10
PFHpA_2	362.9	318.9	-10	-10	-20	-10
PFOA_1	412.9	169	-35	-10	-15	-10
PFOA_2	412.9	368.9	-35	-10	-20	-10
PFNA_1	462.9	218.9	-20	-10	-14	-10
PFNA_2	462.9	418.9	-20	-10	-23	-10
PFDA_1	512.9	268.9	-20	-10	-17	-10
PFDA_2	512.9	468.9	-20	-10	-25	-10
PFUnDA_1	562.9	268.8	-20	-10	-17	-10
PFUnDA_2	562.9	518.8	-20	-10	-27	-10
PFDoDA_1	612.9	318.8	-24	-10	-20	-15
PFDoDA_2	612.9	569.9	-24	-10	-28	-15
PFBS_1	298.9	80.2	-61	-10	-64	-10
PFBS_2	298.9	99.1	-61	-10	-36	-10
PFHxS_1	398.9	80.1	-70	-10	-85	-15
PFHxS_2	398.9	99	-70	-10	-80	-15
PFOS_1	498.9	80	-85	-8	-108	-10
PFOS_2	498.9	99.1	-85	10	-96	-10
MPFBA	216.9	171.9	-15	-10	-14	-12
MPFHxA	314.9	269.9	-20	-10	-13	-9
MPFOA	416.9	371.9	-20	-10	-15	-9
MPFNA	467.9	422.9	-20	-8	-15	-10
MPFDA	514.9	469.9	-20	-15	-15	-10
MPFUdA	564.9	519.8	-15	-15	-18	-10
MPFDoA	614.9	569.9	-30	-10	-20	-30
MPFHxS	402.9	103	-10	-15	-44	-6
MPFOS	502.9	99.1	-85	-9	-95	-6
MPFPeA	266	222	-10	-8	-11	-6

9. TARATURA

Si utilizzano gli Standard multicomponenti di cui alla Tabella B per calcolare le curve di taratura su 5 livelli di concentrazione (più un bianco), impiegando il metodo dello standard interno. Le tarature così effettuate individuano un range di concentrazione nell'estratto metanolico che va da 5 a 200 ng/L.

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MR051.0CVE Pagina n. 9 di 10 Rev. n. 0 del 20/09/2018
ESTRAZIONE DELLE SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN SEDIMENTI, FANGHI, TERRENI E RIFIUTI		

9.1 Taratura e preparazione della sequenza di campioni da analizzare (batch d'analisi)

Il batch d'analisi deve essere composto al massimo da 30 campioni e viene preparato mettendo in successione il bianco reattivi, gli standard (5 livelli), le soluzioni delle carte di controllo (10 ng/L e 100 ng/L) e i campioni seguendo lo schema di seguito riportato:

Bianco reagenti, STD5, STD25, STD50, STD100, STD200; CC 10 ng/L, CC 100 ng/L; Campione1, Campione2... Campione 30 (l'intera sequenza non deve superare le 24 ore complessive di durata). Nella sequenza vanno inseriti almeno 2 soluzioni Spike 80 ng/L per calcolare il limite di ripetibilità (vedi paragrafo 8.3).

Al termine della sequenza si riproccesseranno 2 STD, uno a bassa concentrazione (es. STD5, STD25) e uno ad alta concentrazione (es. STD100 STD200) che dovranno rientrare nel 30% di tolleranza per ritenere valida la sequenza. Inoltre al termine della sequenza viene ri-analizzato in doppio un campione qualsiasi e uno SPIKED al limite di quantificazione per valutare il recupero. Tale recupero deve essere compreso tra 35 e 150%.

10. CALCOLI ED ESPRESSIONE DEL RISULTATO

Prima di procedere alla stima della concentrazione è necessario verificare la corretta identificazione dell'analita in esame controllando che vengano rispettate le seguenti condizioni:

- 1) il rapporto tra le transizioni (ove possibili) non deve mai superare il $\pm 25\%$ della media del rapporto di transizione degli std di taratura per PFOA e PFOS. Non deve superare il 30% per gli altri analiti.
- 2) il rapporto tra tempo di ritenzione dell'analita e quello dello std interno (RT relativo) non deve mai superare $\pm 0.5\%$ la media del rapporto di transizione degli std di taratura per PFOA e PFOS. Per gli altri analiti lo scostamento massimo dalla media non deve superare il $\pm 1\%$.

10.1 Calcoli

Le concentrazioni [c] degli analiti si ricavano dalla curva di taratura costruita per ciascun composto. Se la concentrazione di un campione risulta superare il limite massimo del range di cui al punto 9, il campione viene diluito opportunamente e riproccessato come indicato nel paragrafo 8. Il risultato viene fornito dal report strumentale in ng/L e tiene già conto delle diluizioni effettuate.

Nel caso di preparazione "off line" il risultato strumentale viene diviso per il fattore di concentrazione e riportato alla concentrazione dell'estratto del campione di partenza espressa in ng/L.

La concentrazione degli analiti nel campione di sedimenti, fanghi, terreni o rifiuti da riportare nei rapporti di prova in mg/kg viene calcolata come segue:

$$[C] \text{ mg/Kg} = \frac{[c] \cdot V_{\text{Estratto}} \cdot V_{\text{Finale}}}{V_{\text{Prelevato}} \cdot P_{\text{Ricostruito}}} \cdot 10^{-6}$$

Dove:

- [c] : concentrazione letta allo strumento (ng/L)
 V_{Estratto} : 10 mL, nelle condizioni del metodo
 V_{Finale} : volume a cui si porta l'eluato dopo la purificazione SPE (mL)
 $V_{\text{Prelevato}}$: volume di campione passato in SPE in (mL)

ARPA Veneto	PROCEDURA DI PROVA	MR051.0CVE Pagina n. 10 di 10 Rev. n. 0 del 20/09/2018
ESTRAZIONE DELLE SOSTANZE PERFLUOROALCHILICHE (PFAS) IN SEDIMENTI, FANGHI, TERRENI E RIFIUTI		

$P_{\text{Ricostruito}}$: quantità di campione pesata (g), eventualmente ricalcolata tenendo conto del Fattore correttivo (F_c) (vedi procedura di prova MR040.CVE)

I risultati, nei rapporti di prova, vengono espressi al massimo con due cifre significative.

11. PARAMETRI STATISTICI

11.1 Criteri accettabilità della curva di taratura

La taratura viene effettuata in ogni sessione d'analisi valutando il coefficiente di correlazione che deve essere $r^2 > 0.990$, inoltre le due carte di controllo devono rispettare i criteri al paragrafo 11.4.

11.2 Recupero

I recuperi vengono stimati impiegando come matrice un sedimento fortificato come descritto al paragrafo 8.2. I risultati verranno riportati nel rapporto di validazione.

11.3 Carte di controllo

Il metodo è tenuto sotto controllo con le modalità indicate nella procedura di prova MW089.0CVE.

11.4 STD di controllo batch

Il batch è tenuto sotto controllo con le modalità indicate nella procedura di prova MW089.0CVE.

11.5 Incertezza di misura

È stata calcolata secondo quanto previsto dalla PG37DL "Valutazione e controllo dell'incertezza di misura per prove chimiche e fisiche" seguendo le modalità indicate nel progetto di validazione. I risultati ottenuti sono riassunti nel rapporto di validazione.

12. NORMATIVA

- 12.1 D. Lgs. 03/04/2006 n. 152 – Norme in materia ambientale
- 12.2 D.M. 27/09/2010 – Definizione dei criteri di ammissibilità dei rifiuti in discarica
- 12.3 Parere I.S.S. N° 23954 AMPPIA12

13. BIBLIOGRAFIA

Environment International 59 (2013) 389-397, Perfluoroalkyl substances and extractable organic fluorine in surface sediments and cores from Lake Ontario.
J. W. Washington et al. *Environmental Science and Technology*, vol. 48, 2014, pp. 5762-5769

Annex VI

PROCEDURE FOR THE ANALYSIS OF VEGETABLE AND ANIMAL ORGANISMS

1. Campionamento e trattamento dei campioni destinati all'analisi dei PFAS

L'area di prelevamento dei campioni è stata suddivisa in dieci zone, a ciascuna delle quali è stato attribuito un colore sulla base del livello di contaminazione da PFAS.

Dopo essere stati raccolti, tutti gli campioni animali, una volta pesati, sono trasferiti in provette Falcon di polipropilene da 15 mL, insieme a 7 mL di acetonitrile. Al contrario, le piante sono trattate in modo tale da disporre di due *pool* di campioni, uno destinato alla sola determinazione del peso secco mentre l'altro è riservato all'analisi chimica. Di seguito è illustrato il protocollo relativo al campionamento delle specie vegetali.

1.1 Protocollo di campionamento, conservazione e determinazione del peso secco dei campioni vegetali

MATERIALE NECESSARIO

Forbici e/o taglierino, acqua deionizzata, carta assorbente, sacchetti di plastica per congelatore, bilancia tecnica, stufa per essiccare, righello, pennarello/matita, congelatore.

PROCEDURA

- Campionare 3 piante (a,b,c) per ogni coltura (*Zea mays* = ZM, *Phragmites australis* = PA, *Allium cepa* = AC, *Radicchio* = RA) per ogni zona (Bianca = B, Verde 1 = V1, Verde 2 = V2, Verde 3 = V3, Gialla 1 = G1, Gialla 2 = G2, Gialla 3 = G3, Rossa 1 = R1, Rossa 2 = R2, Rossa 3 = R3);
- Fotografare i campioni se possibile;
- Sciacquare le radici con acqua deionizzata e asciugarli superficialmente con carta assorbente;
- Registrare peso (pianta intera) e lunghezza (solo parte epigea) di ogni pianta;
- Separare radici, fusto e foglie di ogni singola pianta;
- Pesare radici, fusto e foglie di ogni singola pianta;
- Dalle tre piante della stessa zona preparare un *pool per l'analisi* per ogni frazione della pianta:
 - per comporre un pool prelevare una quantità equivalente di radici (o fusto o foglie) in modo da ottenere un campione (pool di 3 piante della stessa coltura) di circa 60 g;
 - registrare il peso di ogni aliquota che compone il campione;
- Dalle tre piante della stessa zona preparare un secondo *pool per la determinazione del peso secco* per ogni frazione della pianta con le stesse modalità. Determinazione peso secco: lasciare il campione in stufa a 105°C per almeno 2 ore, se il campione occupa troppo spazio per la stufa ridurre la quantità totale da destinare alla determinazione del peso secco (es. 20 g anziché 60 g);
- Mettere il campione (*pool per l'analisi*) in sacchetti di plastica per alimenti. Spingere il campione bene sul fondo in modo da poter arrotolare il sacchetto intorno al campione che deve assumere una forma di cilindro allungato;
- Scrivere su ogni sacchetto la sigla del pool come indicato nelle tabelle;
- Congelare a -21°C.

2. Preparazione dei campioni animali e vegetali

L'estrazione dei campioni biologici è condotta secondo il metodo Lacina *et al.* (2011) modificato. Alcuni grammi di campione sono quindi trasferiti in provette Falcon da 15 mL e addizionati con standard interno marcato (SIL-IS, "Stable Isotopic Labelled-Internal Standard" Wellington Laboratories, Guelph, ON, Canada). A questi si aggiungono 1,5 mL di acqua e acetonitrile in rapporto 10:90 e 40 µL di acido formico per ogni grammo di campione. I campioni sono quindi passati al vortex per 1 minuto, sonicati per 15 minuti e infine centrifugati per 10 minuti a 11000 rpm a 10°C. A questo punto, il surnatante formatosi deve essere prelevato con una pipetta Pasteur e trasferito in una nuova provetta Falcon da 15 mL. Dopo aver ripetuto il procedimento di estrazione per altre due volte, unendo il surnatante a quello precedente, si aggiungono alla soluzione finale 0,2 g di NaCl e 0,6 g di MgSO₄ anidro (essiccato in muffola a 500°C per 5 h), per ogni grammo di campione. Immediatamente agitati, i campioni vengono poi posti nuovamente in centrifuga per 10 minuti a 11000 rpm a 10°C e tenuti in congelatore per una notte.

Il giorno successivo, il campione viene concentrato sotto flusso di azoto a 40°C fino a circa 1 mL. Il volume finale dell'estratto è determinato per pesata mediante l'utilizzo di una siringa, con la quale il campione viene prelevato e fatto passare per gravità attraverso una cartuccia HybridSPE[®] Phospholipid Ultra per la rimozione dei fosfolipidi. Il liquido percolato dalla cartuccia viene infine acidificato con 50 µL di acido formico e trasferito in un'apposita vial per l'autocampionatore del sistema UHPLC-MS/MS.

3. Determinazione dei PFAS nei campioni animali e vegetali

La determinazione dei composti perfluoroalchilici negli estratti di campioni biologici, dopo la rimozione dei fosfolipidi, è effettuata mediante UHPLC-MS/MS accoppiata alla purificazione on-line del campione con sistema TFC.

3.1 Purificazione online degli estratti mediante TFC (*Turbulent Flow Chromatography*)

L'analisi on-line TFC-UHPLC, operante in modalità *Isocratic Focusing*, è condotta mediante il sistema Thermo EQUAN modificato costituito da un autocampionatore CTC PAL dotato di 4 valvole VICI Cheminert a 6 vie, da due pompe di loading UHPLC ACCELA (600 e 1200, Thermo Fisher Scientific) munite di sistema TFC collegato in serie (Thermo Fluoro XL, 50 × 0,5 mm and Thermo Cyclone™, 50 × 0,5 mm) e da una colonna analitica (Thermo Hypersil GOLD PFP 1,9 µm, 50 x 2.1 mm) (Manzoni et al., 2013)

Nelle tabelle 1 e 2 sono riportate, rispettivamente, le condizioni operative delle fasi di purificazione TFC e di separazione analitica mentre in tabella 3 è riportato il gradiente di eluizione della separazione analitica.

Tabella 1. Condizioni operative della fase di purificazione TFC

Pompa di loading	Thermo ACCELA 600 pump
Colonne di purificazione	Thermo Cyclone TM (0,5x50 mm) e Thermo Fluoro XL (0,5x50 mm)
Fase mobile	(A) 0,1 % HCOOH; (B) MeOH; (C) acetonitrile:isopropanolo:acetone (45:45:10); (D) 2 mM NH ₄ OAc + 5% MeOH
Flusso	vedi Tabella 3
Temperatura	ambiente
Gradiente	vedi Tabella 3
Loop	100 μ L

Tabella 2. Condizioni operative della fase analitica

Pompa analitica	Thermo ACCELA 1250 pump
Colonna di separazione	Thermo Hypersyl GOLD PFP (2,1x50 mm; 1,9 μ m)
“Trap column”	Thermo GOLD Hypersil (2,1x50 mm; 1,9 μ m) posta tra la pompa analitica e la valvola di iniezione
Fase mobile	(A) 2 mM NH ₄ OAc + 5% MeOH; (B) MeOH
Flusso	vedi Tabella 3
Temperatura	ambiente
Gradiente	vedi Tabella 3

Tabella 3. Gradiente degli eluenti durante l’analisi

Fase	Tempo (min)	Pompa analitica			Pompa di caricamento del campione (<i>loading</i>)				
		Flusso (μ L/min)	A%	B%	Flusso (μ L/min)	A%	B%	C%	D%
A+B	0,00	300	95	5	2000	100	0	0	0
	0,99				2000	100	0	0	0
C+D	1,00	200	95	5	100	0	5	0	95
	2,00	200	95	5	100	0	5	0	95
	2,99	200	62,5	37,5					
E	3,00	300	62,6	37,5	100	0	37,5	0	62,5
	3,01				200	0	0	0	100
	4,00	300	30	70					
	9,00	300	30	100	200	0	0	100	0
	11,99				200	0	0	100	0
	12,50	300	0	100					
	12,99				200	100	0	0	0
	14,50	300	95	5					
16,50	300	95	5	200	100	0	0	0	

3.2 Analisi in spettrometria di massa

Al termine della separazione cromatografica gli analiti sono analizzati mediante spettrometro di massa a triplo quadrupolo con sorgente di elettro-nebulizzazione ESI (*Electrospray Ionisation*), operante in modalità negativa e MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) con risoluzione di 0,7 Da. I parametri dello spettrometro di massa sono elencati nella tabella 4, mentre nella tabella 5 sono riportate le transizioni MS/MS per ogni composto, le energie di collisioni e il *tube lens offset*. Per il controllo degli strumenti, l'acquisizione e l'elaborazione dei dati è stato utilizzato il software "Xcalibur 2.1" di Thermo Scientific.

Tabella 4. Condizioni operative dello spettrometro di massa

Spettrometro di massa	Thermo Quantum Access Max		
Sorgente di ionizzazione	HESI, Heated Electrospray Ionisation		
	"Spray Voltage"	3500 V	
	"Capillary Temperature"	270 °C	
	"Sheath Gas"	25 au	
	"Auxiliary Gas"	10 au	
	"Vaporizer Temperature"	40°C	
Condizioni di ionizzazione	Ionizzazione negativa		
Modalità di acquisizione degli ioni	Multiple Reaction Monitoring (MRM).		
Gas di collisione	argon		
Pressione del gas di collisione	1,5 (mTorr)		

Tabella 5. Parametri LC/MS/MS per gli analiti e gli standard di riferimento marcato (SIL-IS) utilizzati nella validazione del metodo

	Analiti	RT min	Ione Precursore (m/z)	Ioni Prodotti (m/z)	Energia di collisione	Tube lens offset
Acido perfluoropentanoico	PFPeA	4,3	262,9	69	39	85
				218,9	11	
Acido perfluoroesanoico	PFHxA	4,6	312,9	119,1	22	86
				268,9	11	
Acido perfluoroeptanoico	PFHpA	4,9	362,9	169	18	91
				318,9	12	
Acido perfluorooottanoico	PFOA	5	412,9	169	19	96
				368,9	13	
Acido perfluorononanoico	PFNA	5,3	462,9	218,9	18	104
				418,9	13	
Acido perfluorodecanoico	PFDA	5,5	512,9	268,9	18	97
				468,9	13	
Acido perfluoroundecanoico	PFUnDA	5,7	562,9	268,8	20	96
				518,8	14	
Acido perfluorododecanoico	PFDoDA	6	612,9	318,8	20	107

				568,9	14	
Acido perfluorobutansolfonico	PFBS	4,4	298,9	80,2	44	85
				99,1	32	
Acido perfluoroesansolfonico	PFHxS	4,8	398,9	80,1	38	91
				99	34	
Acido perfluoroottansolfonico	PFOS	5,2	498,9	80,3	45	104
				99,1	45	
Acido perfluoro- <i>n</i> -[¹³ C ₄] butanoico	¹³ C ₂ -PFH _x A	4,6	314,9	269,9	11	86
Acido perfluoro- <i>n</i> -[¹³ C ₂] hexanoico	¹³ C ₄ -PFOA	5	416,9	371,9	13	96
Acido perfluoro- <i>n</i> -[¹³ C ₄] octanoico	¹³ C ₅ -PFNA	5,3	467,9	422,9	13	104
Acido perfluoro- <i>n</i> -[¹³ C ₅] nonanoico	¹³ C ₂ -PFDA	5,5	514,9	469,9	13	97
Acido perfluoro- <i>n</i> -[¹³ C ₂] decanoico	¹³ C ₂ -PFUnDA	5,7	564,9	519,8	14	96
Acido perfluoro- <i>n</i> -[¹³ C ₂] undecanoico	¹³ C ₂ -PFDoDA	6	614,9	569,9	14	107
Acido perfluoro- <i>n</i> -[¹³ C ₂] dodecanoico	¹⁸ O ₂ -PFH _x S	4,8	402,9	103	34	91
Acido perfluoro- <i>n</i> -esan [¹⁸ O ₂] solfonico	¹³ C ₄ -PFOS	5,2	502,9	99,1	45	104

3.3 Quantificazione dei PFAS

Gli analiti sono identificati comparando il loro tempo di ritenzione (RT) con quello del rispettivo standard di riferimento (deviazione $\leq 0.25\%$) o con il valore riportato in letteratura. Per tutti i composti sono considerati lo ione precursore e i due ioni prodotti. Per l'analisi quantitativa sono state costruite rette di calibrazione con il metodo della diluizione isotopica con standard multicomponente in acetonitrile acidificati con acido formico (50 μ L HCOOH in 1 mL di standard). Sono stati utilizzati 10 standard multicomponente da 0 a 800 μ g/L di nativo e 4 μ g/L di SIL-IS.

Per la quantificazione di PFBS senza specifico SIL-IS si è scelto di utilizzare, come surrogato il ¹³C₂-PFH_xS, composto marcato perfluoroesansolfonato (composto perfluosolfonato con simile tempo di ritenzione).

3.4 Validazione

Il metodo sopra descritto è stato sottoposto a procedura di validazione utilizzando 10 g di tessuto molle di bivalve (vongola) come matrice di prova.

3.4.1. Effetto matrice

Per valutare se le molecole presenti nella matrice, che coeluiscono con gli analiti, hanno un effetto positivo o negativo sull'efficienza di ionizzazione si confronta la risposta degli estratti di vongola, addizionati con standard nativi a due diverse concentrazioni (2 e 15 µg/L), con quella delle soluzioni di riferimento alle stesse concentrazioni.

Se il rapporto è <100% significa che il segnale, e quindi la ionizzazione, è stato soppresso, mentre valori >100% indicano un incremento del segnale e quindi della ionizzazione. La tabella 6 mostra una minore soppressione della ionizzazione (tra 1 e 25%) per PFOA, PFDoDA, PFHxS e PFOS mentre la soppressione è più marcata (tra 34 e 60%) per tutti gli altri composti.

Per correggere l'effetto matrice si utilizzano composti marcati con isotopi stabili (SIL-IS) come standard interni, utili anche a compensare il recupero di estrazione e la variabilità d'iniezione e dei parametri strumentali. La soluzione SIL-IS è stata aggiunta sia agli estratti di biota sia alle soluzioni standard per raggiungere la concentrazione finale di 4 µg/L.

Tabella 6. Effetto matrice in estratti di bivalvi. $ME (\%) = (Area_{molluschi} \times Area_{std}) \times 100$; (N = 3).

Composti	Effetto matrice (%)		Effetto matrice (%)	
	Nativo 2 µg/L	SIL-IS 4 µg/L	Nativo 15 µg/L	SIL-IS 4 µg/L
PFPeA	n.d.	n.a.	41	n.a.
PFHxA	40	42	40	46
PFHpA	43	n.a.	46	n.a.
PFOA	75	109	98	94
PFNA	66	51	57	55
PFDA	57	52	57	57
PFUnDA	66	54	55	54
PFDoDA	99	87	83	84
PFBS	n.d.	n.a.	49	n.a.
PFHxS	85	81	81	93
PFOS	n.d.	135	99	149

n.d.: non determinato, perché <LOD; n.a.:SIL-IS non disponibile per questo composto

3.4.2 Intervallo di linearità e limiti di rivelabilità

La linearità è stata valutata iniettando 7 livelli di soluzioni standard multicomponente (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; 50 µg/L per PFUnDA e PFDoDA e 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 µg/L per i restanti composti) addizionati con SIL-IS a 4 µg/L. Le linearità è buona con coefficienti di determinazione $R^2 > 0,987$ per tutti i composti (Tabella 7). I limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono stati misurati secondo la norma ISO 6107-2:2006 come tre e dieci volte, rispettivamente, la deviazione standard dello standard

multicomponente più basso (ILOD e ILOQ) e di un estratto di mollusco (MLOD e MLOQ) fortificato a 1 µg/L. ILOD e ILOQ, che rappresentano i limiti di rivelabilità strumentali, variano da 0,02 a 0,2 e da 0,04 a 0,7 ng/g p.f. rispettivamente, mentre MLOD e MLOQ, limiti di rivelabilità del metodo, sono compresi tra 0,03 a 0,3 e tra 0,1 e 0,9 ng/g p.f. rispettivamente (Tabella 7).

Tabella 7. Parametri di validazione: linearità e sensibilità

Composti	Linearità		Sensibilità (ng/g p.f.)			
	(µg/L)	R ²	ILOD	ILOQ	MLOD	MLOQ
PFPeA*	1-100	0,997	0,2	0,7	0,3	0,9
PFHxA	1-100	0,994	0,1	0,2	0,06	0,2
PFHpA*	1-100	0,998	0,04	0,1	0,1	0,4
PFOA	1-100	0,997	0,03	0,1	0,1	0,4
PFNA	1-100	0,992	0,04	0,1	0,07	0,2
PFDA	1-100	0,995	0,03	0,07	0,07	0,2
PFUnDA	0,5-50	0,997	0,02	0,04	0,04	0,1
PFDoDA	0,5-50	0,998	0,03	0,08	0,03	0,1
PFBS*	1-100	0,999	0,2	0,4	0,3	0,8
PFHxS	1-100	0,989	0,03	0,07	0,1	0,2
PFOS	1-100	0,987	0,04	0,1	0,2	0,5

* Valori corretti con ¹³C2-PFHxA.

3.4.2 Accuratezza

La precisione del metodo è stata valutata come la deviazione standard di quattro iniezioni ripetute per tre giorni non consecutivi di soluzioni standard multicomponenti e di estratti di biota fortificati. Sia la ripetibilità (precisione *intra-diem*) sia la riproducibilità (precisione *inter-dies*) sono migliori per i PFCA, senza mostrare differenze significative tra le soluzioni standard e gli estratti. Per le alte concentrazioni la ripetibilità varia da 3 a 8% per PFCA e da 5 a 13% per PFSA mentre la riproducibilità varia da 4 a 17% e da 12 a 27% per PFCA e PFSA rispettivamente.

Non essendo disponibili per i PFAS materiali di riferimento certificati in matrice biologica, l'accuratezza, espressa come recupero percentuale, è stata stimata analizzando campioni reali fortificati a due concentrazioni (0,4 e 3 ng/g p.f.) e bianchi fortificati a 1,5 ng/g p.f. (Tabella 8). Si ottengono recuperi soddisfacenti per PFCA (98-133%), mentre sono inferiori per PFSA (40-60%), probabilmente perché il metodo è dieci volte meno sensibile per i composti solfonati rispetto ai carbossilati.

Tabella 8. Parametri di validazione: accuratezza

Composti	Precisione sol. std (%RSD)				Precisione in estratti (RSD%)				Recupero (%)		
	<i>Intra-diem</i> 2 µg/L	<i>Inter-dies</i> 2 µg/L	<i>Intra-diem</i> 10 µg/L	<i>Inter-dies</i> 10 µg/L	<i>Intra-diem</i> 4 µg/L	<i>Inter-dies</i> 4 µg/L	<i>Intra-diem</i> 30 µg/L	<i>Inter-dies</i> 30 µg/L	Bianco 1,5 ng/g p.f.	Biota 0,4 ng/g p.f.	Biota 3 ng/g p.f.
PFPeA*	7	9	6	14	19	36	5	11	96	<LOQ	120
PFHxA	9	28	8	17	8	21	4	13	104	65	98
PFHpA*	12	9	8	7	10	6	8	4	135	<LOQ	132
PFOA	16	14	3	12	13	6	5	13	121	134	133
PFNA	7	16	4	19	4	6	3	9	108	101	109
PFDA	12	1	5	10	8	6	2	9	111	106	109
PFUnDA	13	8	5	10	12	10	4	7	112	97	111
PFDoDA	3	8	4	11	6	13	4	5	107	95	109
PFBS*	34	40	8	15	15	26	10	19	51	86	60
PFHxS	21	13	13	20	7	26	6	12	100	49	53
PFOS	47	38	7	13	18	9	5	27	71	29	40

Le concentrazioni sono state calcolate con il metodo della diluizione isotopica. * Valori corretti con ¹³C₂-PFHxA