



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

Corso di Laurea Magistrale  
in Chimica e tecnologie  
sostenibili

Tesi di Laurea

**Sviluppo di protocolli per la determinazione di  
composti organici in acqua mediante cromatografia,  
validazione di un metodo e sua verifica prestazionale**

**Relatore**

Ch. Prof. Andrea Gambaro

**Correlatore**

Dott. Mauro Fallica

**Laureanda**

Francesca Breda

Matricola 839027

**Anno Accademico**

2019 / 2020



**INDICE**

1 Introduzione	1
1.1 Acqua: Res Communes Omnium	1
1.2 Il Laboratorio	5
1.3 Sigle e Abbreviazioni	6
2 Scopo della tesi	8
3 Inquinanti dell'acqua	9
3.1 Composti Organostannici	9
3.1.1 Struttura e proprietà degli OTC	9
3.1.2 Origine ed usi degli OTC	9
3.1.3 Tossicità	11
3.1.4 Immissione	12
3.1.5 Legislazione	13
3.2 Composti Bifenili Policlorurati	14
3.2.1 Struttura e proprietà	14
3.2.2 Origine ed usi	14
3.2.3 Tossicità	16
3.2.4 Immissione	17
3.2.5 Legislazione	17
4 Estrazione	20
4.1 Estrazione liquido-liquido	20
4.2 Estrazione in fase solida SPE	22
5 Validazione di un metodo analitico	24
5.1 Lo sviluppo di un metodo	24
5.2 Caratteristiche di prestazione di un metodo	25
6 OTC – Parte Sperimentale	27
6.1 Metodo sviluppato	27

6.1.1 Sostanze utilizzate	27
6.1.2 Apparecchiature utilizzate	28
6.1.3 Matrici in esame: acqua potabile, sotterranea e di scarico	29
6.1.4 Procedura Sperimentale	30
6.1.5 Analisi Strumentale	33
6.2 Risultati, discussione e confronto tra matrici	35
6.2.1 Calibrazioni	35
6.2.2 Errori e Incertezze	42
6.2.3 Validazione	44
7 PCB – Parte Sperimentale	51
7.1 Metodo sviluppato	51
7.1.1 Sostanze utilizzate	51
7.1.2 Apparecchiature utilizzate	52
7.1.3 Procedura Sperimentale	53
7.1.4 Analisi Strumentale	54
7.2 Risultati, discussione e confronto tra matrici	57
7.2.1 Calibrazioni	57
7.2.2 Errori e Incertezze	63
7.2.3 Validazione	66
7.3 Test di ottimizzazione	71
8 Conclusioni	74
9 Appendici	75
9.1 Workflow ufficiale OTC	75
9.2 Workflow ufficiale PCB	76
10 Bibliografia	77

# 1 Introduzione

## 1.1 Acqua: Res Communes Omnium

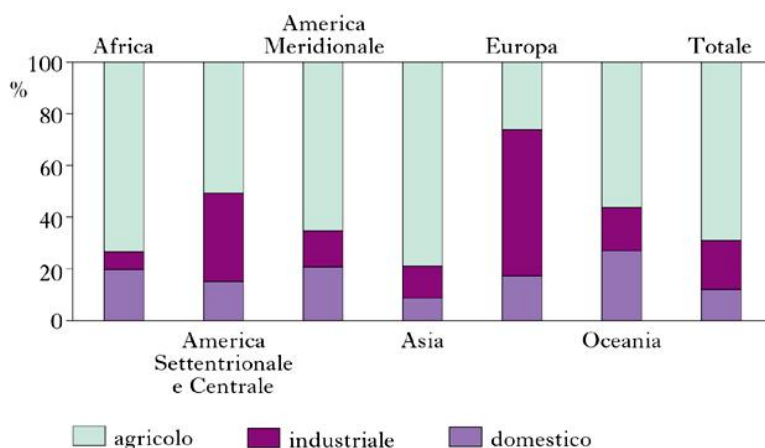
L'acqua è da sempre un bene essenziale per l'umanità: abbondantemente presente sulla terra è parte integrante di tutti gli organismi viventi oltre che essere una risorsa socio-economica fondamentale. Il nostro pianeta è ricoperto prevalentemente di acqua, ma solamente il 2,5 % risulta essere dolce. Di questa percentuale:

- Il 68,9 % si trova nelle nevi e nelle calotte polari;
- Il 30,5 % si trova sotto forma di acqua sotterranea;
- Lo 0,3 % si trova sotto forma di acqua superficiale.

Il quantitativo realmente utilizzabile risulta, quindi, essere l'1% del totale ed è pertanto necessario un controllo efficiente volto a garantire questo bene comune alle future generazioni<sup>(1)</sup>.

La presenza di fenomeni quali l'aumento demografico, la riduzione delle risorse, i cambiamenti climatici e l'inquinamento comporta per questa risorsa l'epiteto di "oro blu".

L'acqua potabile ha differenti impieghi nei settori riguardanti l'agricoltura (70 %), l'industria (20 %) e gli usi domestici (10 %). Nella **Figura 1.1** sono riportati i differenti consumi di acqua a seconda dei paesi, in accordo con i dati del Pacific Institute.



*Fig. 1.1, Impieghi dell'acqua<sup>(2)</sup>*

Allo scopo di tutelare l'acqua, nel corso degli ultimi decenni diverse organizzazioni internazionali hanno presentato iniziative. Una tra queste è Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile<sup>(3)</sup>, sottoscritta nel 2015 da 193 Paesi membri dell'ONU, la quale presenta un programma d'azione con 169 traguardi da raggiungere entro i prossimi 15 anni. Tra i 17 *target* riportati viene considerata l'acqua (**Figura 1.2**) con l'obiettivo di renderla universalmente accessibile e migliore in termini qualitativi e di gestione.



*Fig. 1.2, Obiettivo 6 Agenda 2030<sup>(3)</sup>*

Una delle maggiori preoccupazioni per questa risorsa è il rischio di contaminazione. L'inquinamento idrico comporta una qualsiasi variazione a livello chimico, fisico o biologico dello stato qualitativo dell'acqua, con conseguenze sulla salute umana e ambientale. Visti i distinti impieghi si hanno differenti tipi di inquinamento, tra i quali si manifestano maggiormente:

- Inquinamento da uso domestico: relativo allo scarico dei liquami di fogna, i quali contengono alte quantità di sostanze organiche e saponi;
- Inquinamento da uso agricolo: derivato dall'impiego eccessivo e spesso scorretto di pesticidi e fertilizzanti, i quali si accumulano nel terreno e nelle falde;
- Inquinamento da uso industriale: per lo scarico di sostanze pericolose in quantità superiori alla norma derivate dalla produzione industriale.

Per tutelare la qualità e la purezza dell'acqua, il 23 ottobre 2000 è stata varata dal Parlamento Europeo e del Consiglio dell'Unione Europea la Direttiva Quadro Acque 2000/60/CE<sup>(5)</sup>. Essa è una legge comunitaria di ambito ambientale il cui scopo riguarda il monitoraggio e il miglioramento delle condizioni degli ecosistemi acquatici, terrestri e delle zone umide ai fini del raggiungimento di un buono stato delle acque superficiali, inizialmente posto entro il 2015, e successivamente prorogato, per 2 volte di 6 anni, al 2027<sup>(6)</sup>.

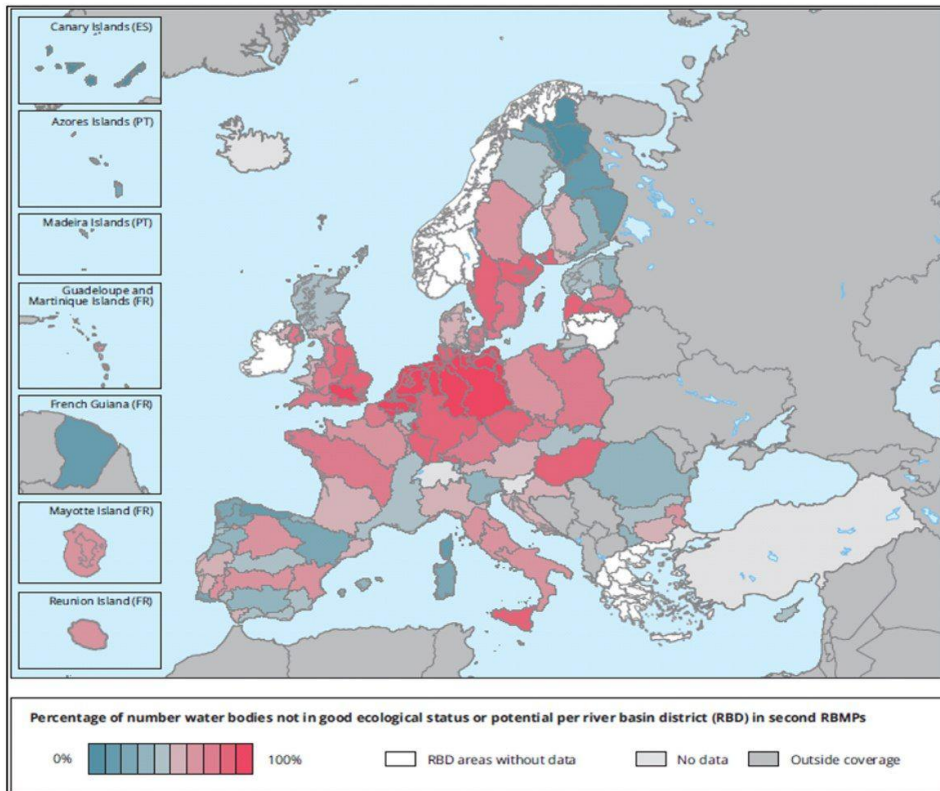
La Direttiva richiede agli Stati membri dell'UE una costante analisi dell'impatto dell'attività umana sui vari corpi idrici che popolano il territorio fornendo una serie di parametri necessari per la classificazione. Oltre a informazioni che riguardano la progettazione dei relativi piani di gestione elenca i principali inquinanti da sottoporre ad un attento monitoraggio. Tra le sostanze prioritarie incluse (**Tabella 1.1**) vi sono i composti organostannici e le sostanze organiche tossiche persistenti e bioaccumulabili.

Elenco Indicativo dei Principali Inquinanti	
1.	Composti organoalogenati e sostanze che possono dare origine a tali composti nell'ambiente acquatico
2.	Composti organofosforici
3.	Composti organostannici
4.	Sostanze e preparati, o i relativi prodotti di decomposizione, di cui è dimostrata la cancerogenicità o mutagenicità e che possono avere ripercussioni sulle funzioni steroidea, tiroidea, riproduttiva o su altre funzioni endocrine connesse nell'ambiente acquatico o attraverso di esso
5.	Idrocarburi persistenti e sostanze organiche tossiche persistenti e bioaccumulabili
6.	Cianuri
7.	Metalli e relativi composti
8.	Arsenico e relativi composti
9.	Biocidi e prodotti fitosanitari
10.	Materia in sospensione
11.	Sostanze che contribuiscono all'eutrofizzazione (in particolare nitrati e fosfati)
12.	Sostanze che hanno effetti negativi sul bilancio dell'ossigeno (e che possono essere misurate con parametri come la BOD, COD, ecc...)

*Tabella 1.1, Elenco dei primi 12 inquinanti<sup>(7)</sup>*

Il riesame del buono stato delle acque italiane, come richiesto dalla Direttiva, presentava nel quinquennio 2010-2015 “solo il 43 % dei 7494 fiumi in buono o elevato stato ecologico, il 41 % è al di sotto dell'obiettivo di qualità previsto e ben il 16 % non è ancora stato classificato. Ancora più grave la situazione dei 347 laghi, di cui solo il 20 % è in regola con la normativa europea mentre il 41 % non è stato ancora classificato. Lo stato chimico non è buono per il 7 % dei fiumi e il 10 % dei laghi, mentre per il 18 % e il 42 % rispettivamente non è stato classificato”<sup>(8)</sup>.

Per quanto riguarda l'Unione Europea un quarto delle acque superficiali non soddisfa il livello di qualità richiesto dalla Direttiva Quadro Acque, obiettivo non raggiunto per l'inquinamento persistente dell'acqua<sup>(8)</sup>. La **Figura 1.3** evidenzia la percentuale dei corpi idrici superficiali europei che non hanno raggiunto tale obiettivo.



*Fig. 1.3, Stato ecologico corpi idrici superficiali nell'UE<sup>(9)</sup>*

Da questi dati si evince quanta strada manchi ancora per una completa copertura sul territorio e per il mantenimento di un giusto stato di qualità e purezza dell'acqua. Al di là delle procedure di infrazione che il nostro Paese ha ricevuto sul tema depurazione, lo stato attuale è abbastanza preoccupante vista l'importanza di questa risorsa. Con il passare degli anni, inoltre, si ha avuto un peggioramento della qualità dell'acqua anche per motivi legati ai cambiamenti climatici, i quali portano a situazioni di siccità e inondazioni sempre più frequenti e gravi.

È, quindi, importante proteggere questo bene comune, vulnerabile e non infinito, per tutelare la salute degli esseri viventi e quella dell'ambiente.



## 1.2 Il Laboratorio

Il laboratorio AGROLAB ITALIA presso il quale ho svolto il tirocinio esterno di Laurea Magistrale è situato nello stabilimento aziendale di Altavilla Vicentina e fa parte di AGROLAB GROUP (**Figura 1.4**), un gruppo di laboratori che opera in tutta Europa, sin dal 1986 con sede principale a Bruckberg in Bassa Baviera<sup>(10)</sup>. Ad oggi vanta circa 1500 dipendenti nelle sue 20 sedi, affermandosi come leader del mercato europeo nel settore chimico, fisico, agroalimentare e microbiologico ambientale. I laboratori, specializzati in aree differenti, lavorano tutti con gli stessi standard usando tecnologia analitica all'avanguardia<sup>(10)</sup>.



*Fig. 1.4, Logo AGROLAB GROUP*

La sede in Italia, ex R&C Lab S.r.l., sita ad Altavilla Vicentina, fa parte del gruppo AGROLAB GmbH dal 2014. È un laboratorio indipendente accreditato ACCREDIA dal 1997, certificato secondo le seguenti norme:

- Standard ISO 45001:2018: *sistemi di gestione per la salute e sicurezza sul lavoro.*
- Standard ISO 9001:2015: *sistemi di gestione per la qualità.*
- Standard ISO 14001:2015: *sistemi di gestione ambientale.*
- Standard UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005: *requisiti generali per la competenza dei Laboratori di prova e taratura.*

I servizi svolti da AGROLAB Italia S.r.l. a socio unico riguardano analisi alimentari, ambientali, delle acque e dei mangimi. Il reparto di analisi presso il quale ho svolto il lavoro sperimentale è quello di analisi dei composti semivolatili, della Divisione di gascromatografia ambientale.

### 1.3 Sigle e Abbreviazioni

ADHD	Disturbo da Deficit di Attenzione/Iperattività
APAT	Agenzia per la Protezione dell’Ambiente e per i servizi Tecnici
ARPA	Agenzia Regionale per la Protezione dell’Ambiente
ARPAV	Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale del Veneto
CALSEL	Calibration Standard Equipment
CCV	Continuing Calibration Verification
CEE/CE	Comunità Economica Europea/Comunità Europea
CV%	Coefficiente di Variazione (%)
DBT	Dibutilstagno
DGA	Dose giornaliera ammissibile
DM	Decreto Ministeriale
DPR	Decreto del Presidente della Repubblica
ECD	Electron Capture Detector
EN	Organismo di Nominazione Europea
EDCs	Endocrine Disrupting Chemicals
EPA	United States Environmental Protection Agency
ICV	Independent Calibration Verification
IMO	International Maritime Organization
ISO	International Organization Standardization
ISTD	Standard Interno
LCS	Laboratory Control Sample
LCSD	Laboratory Control Sample Duplicate
LOD	Limite di Rivelabilità
LLE	Estrazione Liquido-Liquido
LOQ	Limite di Quantificazione
MB	Method Blank
MBT	Monobutilstagno
MDL	Method Detection Limit
ONU	Organizzazione delle Nazioni Unite
OTC	Composti Organostannici
POPs	Persistent Organic Pollutants
PTFE	Politetrafluoroetilene
PVC	Polivinilcloruro
SD	Deviazione Standard
SPC	Self-Polishing Copolymer

SPE	Solid Phase Extraction
SVOC	Semi-Volatile Organic Compounds
TARL	Tolerable Average Residue Level
TBT	Tributilstagno
TBTO	Ossido di Tributilstagno
TBTN	Naftalato di Tributilstagno
TPhT	Trifenilstagno
UE	Unione Europea
UNI	Ente Nazionale Italiano di Unificazione
WHO	World Health Organization

## 2 Scopo della tesi

Lo scopo del lavoro sperimentale, svolto nel reparto di gascromatografia ambientale di AGROLAB Italia, è stato quello di implementare un protocollo per la determinazione di composti organostannici e bifenili policlorurati in matrici acquose partendo da protocolli normalizzati che fanno capo a metodi ISO o EPA, come descritto nelle **Sezioni 6.1** e **7.1**, mediante estrazione liquido-liquido.

Per quanto riguarda i composti organostannici (**Capitolo 6**), si è preso a spunto per l'identificazione degli obiettivi di sviluppo la linea guida ARPA, nonché il D.M. 172/2015<sup>(11)</sup> sugli inquinanti prioritari tra cui spicca il tributil stagno (vedi **Sezione 3.1.5**).

Il lavoro sperimentale riportato nel **Capitolo 7**, invece, si è focalizzato sulla necessità di sviluppare un metodo di estrazione liquido-liquido efficiente, senza dover effettuare passaggio in imbuto separatore, dispendioso a livello economico per la grande quantità di solvente coinvolto. Il metodo in uso al laboratorio prevede estrazione SPE (descritta nella **Sezione 4.2**) mediante l'uso di cartucce con riempimento C18.

## 3 Inquinanti dell'acqua

### 3.1 Composti Organostannici

I composti organostannici (OTC) sono particolare oggetto di studio biochimico sviluppato negli ultimi 40 anni. Inizialmente prodotti e usati in quantità consistenti, attualmente vengono sostituiti per il loro risultato tossico nell'ambiente (acque e terreni) e negli organismi (biota e esseri umani).

#### 3.1.1 Struttura e proprietà degli OTC

Questi composti sono costituiti da un atomo metallico centrale, quale lo stagno (Sn), coordinato mediante legami covalenti a uno o più sostituenti organici. La loro formula generale è  $R_nSnX_{(4-n)}$ , dove n varia da 1 a 4, in cui R indica un gruppo alchilico, arilico o cicloalchilico, mentre X indica una specie anionica come alogenuro, ossido, ossidrile, acetato e altri gruppi (**Figura 3.1**).

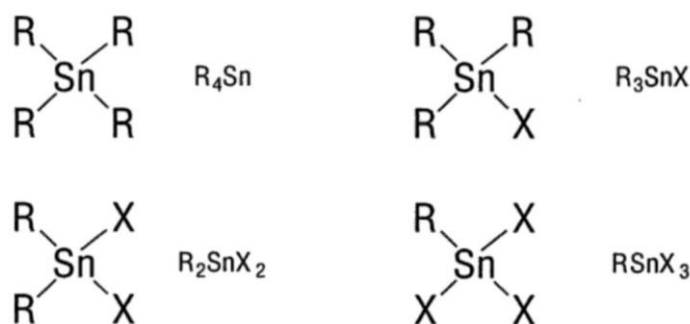


Fig. 3.1, Struttura OTC<sup>(12)</sup>

La natura della specie anionica, oltre a quella dei sostituenti organici e il numero relativo, influenzano sostanzialmente le proprietà chimico-fisiche, l'attività biologica e il comportamento in acqua di questa classe ampia ed eterogenea.

Il legame Sn-C si ritrova ad essere stabile in ambiente acquoso, in presenza di ossigeno e al calore, a differenza di radiazioni ultraviolette e raggi  $\gamma$ , acidi forti e composti elettrofili che riescono a romperlo rapidamente.

Inoltre, è stato studiato come la solubilità varia a seconda della lunghezza della catena alchilica e del numero di sostituenti organici: un aumento di queste due caratteristiche porta ad una diminuzione della solubilità in acqua, e ad un aumento della solubilità in solventi organici poco polari e nei lipidi<sup>(13)</sup>.

#### 3.1.2 Origine ed usi degli OTC

La prima sintesi di un composto organico dello stagno fu realizzata nel 1853 da Edward Frankland, il quale si ritrovò a preparare lo ioduro di dietilstagno. Passarono anni prima che si riuscì a capire il campo di applicazione di questa classe, come conseguenza alla scoperta dell'attività biocida, che portò verso gli anni '50 ad essere

pensati come fungicidi, battericidi e insetticidi. La produzione mondiale vide una crescita esponenziale nei decenni che seguirono, stimando 60000 tonnellate annue nel 2003<sup>(14)</sup>.

Ci sono tre grandi aree in cui gli OTC vengono prodotti e utilizzati: stabilizzanti termici, agenti catalitici e composti con azione biocida<sup>(15)</sup>. Gli organostannici prevengono la degradazione termica di molti composti clorurati (un classico esempio è il PVC) grazie alle proprietà di inibire reazioni di deidrociorurazione, reagire con acido cloridrico per non avere ulteriori eliminazioni e prevenire la rottura del polimero agendo come antiossidanti. I composti acetati vengono impiegati come catalizzatori nelle sintesi di schiume di poliuretano, vasta famiglia di polimeri adoperata quotidianamente in casa e come isolante.

La produzione di OTC usati con scopo non biocida equivale a circa l'80% della produzione totale. Il restante 20% riguarda la loro attività biocida, principalmente come pesticidi e insetticidi per l'agricoltura, sotto forma di tri-sostituenti. Trovano largo impiego in questo settore 7 composti organostannici (TPhTAcO, TPhTOH, TPhTCl, TCyTOH, TCyTX, FBTO) essendo caratterizzati da una bassa fitotossicità e da una elevata e selettiva capacità antiparassitaria<sup>(14)</sup>. Tuttavia, le sostanze utilizzate come preservanti del legno e vernici antivegetative presentano effetti nocivi. Nella preservazione chimica furono introdotte, negli anni '60, formulazioni a base di ossido di TBT (TBTO) e naftalato di TBT (TBTN), sostituite successivamente a causa di questa loro tossicità. Per quanto riguarda l'*antifouling*, nelle vernici antivegetative è presente il TBT acrilato, che dona al sistema SPC il rilascio del biocida tramite idrolisi sulla superficie di contatto. Queste vengono applicate sulle superfici immerse di navi, imbarcazioni, banchine e vasche di raffreddamento di impianti industriali per prevenire la colonizzazione permanente da parte di un complesso di organismi sedentari. La presenza di questi sistemi sugli scafi delle imbarcazioni provoca una diminuzione della massima velocità ottenibile, oltre che ad un peso aggiuntivo<sup>(14)</sup>. In **Tabella 3.1** si riportano le applicazioni più importanti.

Applicazione	Funzione	Principali composti usati
Stabilizzanti del PVC	Contrastano azione luce e calore	$R_2SnX_2$ , $R_4SnX_4$ (R: metile, butile, otile; X: isoottitogliolato, maloato)
Vulcanizzazione schiume poliuretaniche e siliconi RTV	Catalizzatori omogenei	$R_2SnX_2$ DBT diacetato DBT dilaurato
Esterificanti	Catalizzatori omogenei	Acido butanstannoico DBT diacetato DBT ossido
Trattamento superfici di vetro	Precursori film ossido di Sn(IV)	Dimetilstagno cloruro Butilstagno tricloruro Metilstagno tricloruro
Ambito veterinario	Antielmintici del pollame	DBT laurato

Preservanti legno	Funghicidi	TBT naftalato TBT fosfato
Pesticidi	Funghicidi, Insetticidi, Antiparassitari	TPhT acetato TPhT idrossido Tricloroesilstagno ossido
Vernici antivegetative	Biocida	TPhT cloruro, fluoruro TBT cloruro, fluoruro, acrilato
Protezione materiali	Funghicida, alghicida, battericida	TBT benzoato
Trattamenti antitarmici e disinfestazione tessuti	Insetticidi, antiparassitari, battericidi	TPhT cloruro, acetato TBT benzoato

Tabella 3.1, Principali applicazione OTC<sup>(16)</sup>

### 3.1.3 Tossicità

Nei primi anni '80 in Francia si ebbe la prima prova evidente di tossicità, a seguito del pesante calo di produzione di ostriche in uno dei più importanti impianti di marinocultura nella Baia di Arcachon. Le indagini avviate riscontrarono anomalie nella crescita e nella calcificazione della conchiglia, oltre al fatto che i molluschi non depositavano più uova. Fu dimostrato in laboratorio che le anomalie riscontrate non derivavano da problemi di fecondità, ma erano dovute probabilmente dall'inquinamento delle acque<sup>(17)</sup>. Si riscontrarono elevate concentrazioni di TBT a causa delle piccole e grandi imbarcazioni che sostavano nella baia.

Successivi studi evidenziarono che le proprietà tossicologiche sono correlate al grado di sostituzione e alla natura dei sostituenti organici. La tossicità aumenta all'incrementare dei gruppi organici nella struttura chimica, raggiungendo un valore massimo per i tri-sostituiti ( $R_3SnX$ ): il composto più tossico è il TBT.

Ricerche sui gasteropodi portarono alla luce l'azione sul sistema endocrino da parte del TBT, modificandone le caratteristiche sessuali. Da qui ne deriva il termine *imposex*, definizione di sviluppo di caratteristiche sessuali maschili in organismi femminili di *Nucella lapillus*

Si è scoperto che alcune alghe, batteri e funghi degradano il TBT con una progressiva reazione di dealchilazione a DBT e MBT, arrivando, di conseguenza, alla formazione di stagno inorganico<sup>(17)</sup>.

Lo stagno inorganico e i suoi composti non si accumulano negli organismi e dunque non presentano effetti tossici. Nel momento in cui è presente un gruppo organico, si modificano le proprietà chimico-fisiche, la reattività biologica e la persistenza nell'ambiente. I processi di bioaccumulo dipendono dalla lipofilità della sostanza e dalla resistenza al metabolismo. All'aumentare della lunghezza della catena alchilica la tossicità diminuisce.

Si scoprì che i molluschi sono tra gli organismi marini più sensibili all'accumulo di queste sostanze. Di conseguenza, la bioconcentrazione aumenta lungo la catena alimentare<sup>(14)</sup>.

Per quanto riguarda gli esseri umani, le vie di contaminazioni possono essere differenti, dal cibo contaminato alla presenza di inquinamento. Il TARL cerca di stimare il rischio per la salute umana basandosi su risultati evidenziati nell'analisi dei prodotti della pesca.

$$TARL = \frac{DGA * \text{peso medio di una persona}}{\text{consumo giornaliero medio di un alimento}}$$

In tal modo, studi sul consumo di prodotti ittici hanno dimostrato che i consumatori costanti di bivalvi sono persone più a rischio per le elevate concentrazioni di OTC presenti in queste specie<sup>(13)</sup>.

### 3.1.4 Immissione

Ci sono differenti vie di immissione (**Figura 3.2**) degli OTC nell'ambiente e vengono distinte in immissioni dirette e indirette. Il rilascio per volatilizzazione negli inceneritori o per liscivazione dai rifiuti presenti nelle discariche, costituiscono l'inserimento indiretto di sostanze provenienti da applicazioni a scopo non biocida. La quantità di queste immissioni risulterebbe trascurabile rispetto a quella di tipo diretta, proveniente dalle vernici antivegetative. L'impiego di queste sostanze viene evidenziato dalle alte concentrazioni presenti nelle zone portuali e industriali<sup>(14)</sup>.

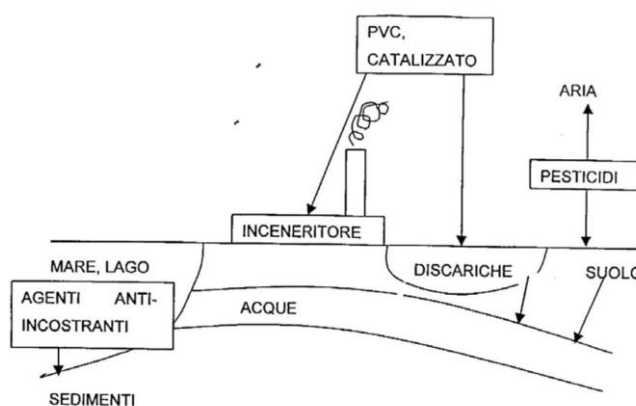


Fig. 3.2, Principali vie di immissione degli OTC<sup>(18)</sup>

Dalle conclusioni dello studio triennale elaborato da ARPAV si evince come in quegli anni di indagine i valori dei contenuti medi di OTC sono aumentati, nonostante siano stati presi dal 1982 provvedimenti legislativi per questi composti. Un monitoraggio più accurato ha portato in evidenza che le massime concentrazioni dei contaminanti non si hanno nel periodo estivo, come inizialmente supposto per il continuo movimento delle imbarcazioni, ma piuttosto nel periodo autunnale-invernale, quando si verificano attività di rimessaggio e manutenzione degli scafi<sup>(14)</sup>.



### 3.1.5 Legislazione

La Francia fu il primo paese a vietare l'uso delle vernici in determinate condizioni, riguardanti la lunghezza delle imbarcazioni e le zone circoscritte. Successivamente, anche altri paesi come Gran Bretagna, Stati Uniti, Svizzera, Germania e Giappone assunsero provvedimenti analoghi.

In Italia una prima normativa risale al D.P.R. n. 904 del 10/09/82<sup>(19)</sup> di recepimento della Direttiva CEE n. 76/769<sup>(20)</sup> relativa ai divieti per la vendita e l'uso delle vernici antivegetative. Successivamente furono necessari ulteriori provvedimenti per attuare le misure relative ai composti OTC: tra le prime la regolamentazione dei prodotti antivegetativi contenenti OTC (Direttiva n. 89/677/CEE<sup>(21)</sup>), seguita dalle Direttive n. 1999/51/CE<sup>(22)</sup> e 2002/62/CE<sup>(23)</sup> con limitazioni aggiuntive verso tutti i tipi di imbarcazioni, contenute nel Regolamento (CE) n. 782/2003<sup>(24)</sup>. Infine, tramite Regolamento (UE) n. 276/2010<sup>(25)</sup> introducendo ulteriori nuove restrizioni e modificando quelle già esistenti.

Dunque, da come si evince, inizialmente furono gli Stati singoli a muoversi verso una restrizione per questi composti. Di particolare importanza, per cui, fu l'impegno che venne assunto dall'unione di questi Stati, che nell'ottobre 2001 si ritrovarono a concludere a Londra la Conferenza internazionale sul controllo dei sistemi antivegetativi nocivi sulle navi che permise all'IMO di stilare una serie di articoli riguardanti misure di controllo sulla vendita e sull'utilizzo di queste vernici a base di TBT e dei rifiuti da smaltire che ne derivano<sup>(26)</sup>. Entrata in vigore dodici mesi dopo dal momento in cui almeno 25 Stati firmarono la Convenzione, nel 2018 è stata firmata da più di 75 Stati<sup>(27)</sup>.

Come riportato nel **Capitolo 2**, si è sentita la necessità di validare una nuova procedura interna al Laboratorio visti i limiti di concentrazione imposti dalla Legge 172-2015<sup>(11)</sup>. Nella Gazzetta Ufficiale viene riportato come standard di qualità in ambiente acquoso, una concentrazione di TBT pari a 0,0002 µg/L.

## 3.2 Composti Bifenili Policlorurati

I PCB sono una classe di composti aromatici biciclici sintetizzate e prodotte fin dal 1930, grazie alla loro ampia versatilità industriale. Attualmente sono banditi per la potenziale tossicità e il bioaccumulo che presentano.

### 3.2.1 Struttura e Proprietà

I PCB si ricavano partendo da petrolio e catrame, per estrazione del benzene che viene successivamente trasformato in bifenile. Quest'ultimo viene clorurato a policlorobifenile, che presenta una formula  $C_{12}H_aCl_b$ .

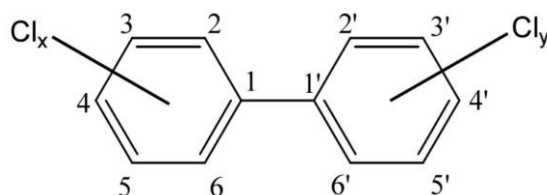


Fig.3.3, Struttura PCB<sup>(28)</sup>

A seconda della disposizione degli atomi di idrogeno e cloro nella molecola (**Figura 3.3**) si possono ottenere fino a 209 congeneri, ognuno classificato mediante nomenclatura IUPAC con relativo numero da 1 a 209. Le miscele dei 209 congeneri PCB sono costituite da miscele commerciali con una frazione di massa totale di cloro tra il 20 e l'80%, valore che cambia a seconda del processo di produzione<sup>(29)</sup>.

I congeneri PCB si possono suddividere in due gruppi a seconda della possibilità di disposizione degli atomi di Cl su un unico anello bifenilico o su entrambi.

Questo tipo di composti hanno proprietà quali stabilità e resistenza ad acidi, alcali e fotodegradazione. Non sono ossidabili e sono poco solubili in soluzione acquosa, ma solubili in fase organica. Inoltre, non sono infiammabili e presentano una temperatura di evaporazione superiore a 800 °C, oltre che una temperatura di degradazione verso i 1000 °C. In acqua espongono sotto forma di sottili pellicole, con densità maggiore del mezzo in questione ed elevata lipoaffinità.

### 3.2.2 Origine ed usi

I PCB erano impiegati principalmente in due campi di applicazione: nei sistemi chiusi, come fluidi dielettrici in apparecchiature elettriche quali trasformatori, e nei sistemi aperti, come additivi per antiparassitari, ritardanti di fiamma, isolanti e vernici (**Tabella 3.2**).

<b>Sistemi chiusi</b>	Olio	Per trasformatori: centrali termoelettriche, navi, industrie, edifici, treni, metropolitane, tram, generatori, televisori, ecc. Per condensatori: centrali, industrie, forni elettrici, navi, motori, lampade a mercurio e fluorescenti, apparecchi telegrafici, lavatrici, frigoriferi, condizionatori d'aria, televisori, elaboratori elettronici, ecc.
	Altri usi	Cavi elettrici, trivelle, ecc.
	Connettore di calore	Apparecchi per riscaldamento e raffreddamento
<b>Sistemi aperti</b>	Olio lubrificante	Apparecchiature operanti ad alta temperatura, alta pressione, sott'acqua, pompe ad olio, compressori
	Elasticizzante	Colle, vernici, grassi sintetici, asfalto, inchiostri per stampe
	Elasticizzante ed isolante	Guaine per conduttori di elettricità, nastri isolanti, altri usi in campo elettrotecnico
	Elasticizzante ed antinfiammante	Fibre sintetiche, plastiche, gomme.
	Carte	Carte autocopianti, carte carbone, carte per fotocopie
	Altri	Tinture per carte, tessuti, vernici per metalli, additivi per anticrittogamici, coloranti per vetro e ceramiche, antipolvere, antiossidanti per fusibili, additivi per petrolio, additivi per fertilizzanti

Tabella 3.2, Utilizzo dei PCB<sup>(30)</sup>

All'inizio del secolo scorso sono state prodotte e, di conseguenza, commercializzate oltre un milione di tonnellate di PCB (dati European Commission, 2000).

Nonostante non siano più prodotti in molti paesi per via della loro tossicità, sono ancora presenti in enormi quantità nelle apparecchiature elettriche, plastiche, in edifici e nell'ambiente.

I PCB sono stati prodotti da molti stati usando denominazioni differenti, tra cui: Aroclor negli USA, Fenclor in Italia, Clophen in Germania e Phenoclor in Francia. Il nominativo Aroclor è identificato da un codice comprendente quattro cifre. Le prime due indicano il tipo di miscela e le ultime due cifre rappresentano il peso % di cloro. Pertanto, l'Aroclor 1260 (**Figura 3.4**) è una miscela bifenile policlorurata con un 60 % in peso media di cloro<sup>(31)</sup>.

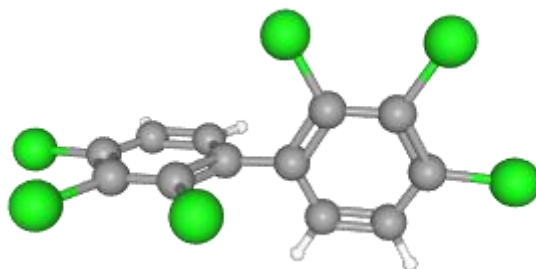


Fig. 3.4, Struttura Aroclor 1260<sup>(32)</sup>

L'unica eccezione di questa nomenclatura è rappresentata dall'Aroclor 1016, il quale ha un contenuto del 41 % in peso medio di cloro<sup>(28)</sup>.

I PCT (policloroterfenili) sono nominati usando come convenzione la serie 5000; ne è d'esempio l'Aroclor 5460 con il 60 % di contenuto medio in peso di cloro<sup>(33)</sup>.

### 3.2.3 Tossicità

La produzione industriale dei PCB, cominciata nel 1930, è stata interrotta fra gli anni Settanta e gli anni Novanta a livello mondiale, e nonostante questo blocco, sono ancora presenti nell'ambiente. La persistenza è dovuta alle caratteristiche chimiche e fisiche, tra cui la scarsa solubilità in acqua e la resistenza alla degradazione di tipo chimico, fisico e biologico. L'accumulo nell'ambiente comporta l'introduzione di questi composti all'interno della catena alimentare, i quali nel tempo arrivano all'uomo. In conseguenza all'assunzione si hanno disturbi a livello cutaneo, di peso, epatico e, addirittura, endocrino e riproduttivo<sup>(34)</sup>.

Dodici dei 209 congeneri dei PCB (coplanari) presentano una tossicità paragonabile a quella delle diossine e dei furani, e vengono definiti con sigla PCB<sub>dl</sub> (**Figura 3.5**) in cui dl indica il termine *dioxin-like*.

	Congeneri
PCB diossina simili (DL)	3,3',4,4' TETRA-CB (PCB 77)
	3,4,4',5 TETRA-CB (PCB 81)
	3,3',4,4',5 PENTA-CB (PCB 126)
	3,3',4,4',5,5' ESA-CB (PCB 169)
	2,3,3',4,4' PENTA-CB (PCB 105)
	2,3,4,4',5 PENTA-CB (PCB 114)
	2,3',4,4',5 PENTA-CB (PCB 118)
	2',3,4,4',5 PENTA-CB (PCB 123)
	2,3,3',4,4',5 ESA-CB (PCB 156)
	2,3,3',4,4',5' ESA-CB (PCB 157)
	2,3',4,4',5,5' ESA-CB (PCB 167)
	2,3,3',4,4',5,5' EPTA-CB (PCB 189)

Fig. 3.5, Elenco PCB<sub>dl</sub><sup>(35)</sup>

Una volta immessi nell'ambiente, i PCB hanno vite differenti: gli isomeri con maggior numero di atomi di cloro sono più stabili, mentre quelli con minor presenza di cloro si ritrovano ad avere una lenta degradazione.

Studi recenti eseguiti da organizzazioni sanitarie di tutto il mondo e riportati dall'WHO, hanno portato in evidenza che l'elevata esposizione ad alcuni PCB è un fattore di rischio per differenti tipi di tumori, quali per esempio il carcinoma mammario delle donne e il cancro alla prostata nell'uomo. Oltre a queste conseguenze, i PCB sono inclusi nella lista di composti EDC, *Endocrine Disrupting Chemicals*. Questa classe è costituita da sostanze chimiche o miscele che vanno ad interferire con il funzionamento degli ormoni presenti nel corpo umano, portando a problemi quali alterazioni della fertilità, del funzionamento nervoso e della funzione immunitaria. Infatti, è stata riconosciuta ai PCB la neurotossicità con impatto negativo sullo sviluppo del cervello, comportando la manifestazione di deficit di attenzione e iperattività definita sotto l'acronimo ADHD<sup>(36)</sup>.

La manifestazione maggiori di queste alterazioni e, di conseguenza, delle malattie è stata associata a zone particolarmente contaminate, quali quelle derivate da disastri su larga scala. Esempi importanti da riportare riguardano l'esposizione di alti livelli di diossine dovuto all'esplosione chimica di Seveso in Italia, e l'avvelenamento di massa per PCB e dibenzofurani policlorurati, causato dall'olio da cucina rispettivamente a Yusho in Giappone e Yucheng in Taiwan. Oltre a questo tipo di contaminazione, effetti simili sono riconducibili all'irrorazione stagionale di colture con pesticidi in agricoltura, pratica consolidata impossibile da trascurare visto l'impatto che ha su numerosi gruppi di persone a stretto contatto<sup>(37)</sup>.

### 3.2.4 Immissione

Nella **Sezione 3.2.2** sono stati descritti due tipi di sistemi in cui i composti PCB sono stati da sempre impiegati. Per quanto riguarda i primi sistemi, la contaminazione ambientale è riconducibile a perdite, incendi, scarichi illeciti e inadeguato smaltimento. Nel caso dei sistemi aperti, invece, presentano fonti di contaminazione mediante discariche, migrazione di particelle e emissione in atmosfera.

Eventuali fonti di contaminazione, di tipo secondario, comprendono l'incenerimento dei rifiuti, la concimazione dei terreni mediante fanghi depurativi provenienti dalle acque di scarico, la combustione di oli usati e le riserve di questi composti aromatici polibifenili in sedimenti marini, fluviali e fanghi di dragaggio dei porti.

L'uomo è esposto a questo tipo di composti mediante inalazione di polveri contaminate, ma principalmente tramite i prodotti alimentari. Gli alimenti grassi, infatti, sono i più contaminati e una volta ingeriti si localizzano nel tessuto adiposo (nervoso, cute, fegato e muscoli scheletrici)<sup>(38)</sup>.

### 3.2.5 Legislazione

Il 22 maggio 2001, a seguito di una conferenza tra Stati, prese forma la Convenzione di Stoccolma (Logo, **Figura 3.6**), un accordo relativo agli inquinanti organici persistenti. Definita mediante sigla POPs, questa nuova classe di inquinanti è stata valutata dannosa per la salute umana e per l'ambiente. La convenzione mira,

dunque, alla precauzione verso queste sostanze e all'eliminazione sicura mediante l'attuazione di norme che regolano produzione, importazione ed esportazione.



Fig. 3.6, Logo Convenzione di Stoccolma<sup>(39)</sup>

Questi inquinanti, prodotti sia intenzionalmente che non, sono sostanze chimiche che presentano proprietà tossiche resistenti alla degradazione e che tendono ad accumularsi negli organismi viventi, mediante la loro presenza in aria e acqua.

Attualmente i firmatari della Convenzione sono 179, tra cui l'Unione Europea, la quale ha adottato questi principi con la direttiva 2006/507/CE del Consiglio<sup>(40)</sup>.

In **Tabella 3.3** sono riportati i relativi inquinanti organici persistenti, elencati a seconda dell'approccio precauzionale sancito dalla Convenzione.

Eliminazione		
Aldrin	Clordano	Dieldrin
Endrin	Eptacloro	Esaclorobenzene
Mirex	Toxafene	<b>Bifenili policlorurati (PCB)</b>
Limitazione		
DDT		
Produzione non intenzionale – fonti antropiche		
Policlorodibenzo-p-diossine e policlorodibenzofurani (PCDD/PCDF)	Esaclorobenzene (HCB)	Bifenili policlorurati (PCB)

Tabella 3.3, POPs<sup>(41)</sup>

Per quanto riguarda i PCB, la Convenzione pone come obiettivo l'eliminazione di questo tipo di inquinante dai sistemi strumentali entro il 2025. Le apparecchiature al cui interno sono presenti in parte i PCB, quali trasformatori e condensatori, devono essere identificati e registrati. La rimozione di tali macchinari avviene con un contenuto di PCB superiore al 10 % con volumi oltre i 5 L, e contenuto superiore allo 0,005 % con volumi oltre i 0,05 L. Inoltre, viene richiesta la promozione di misure riguardanti una riduzione delle esposizioni, di seguito elencate:

- Utilizzo di apparecchiature intatte, in assenza di eventuali perdite;
- Utilizzo vietato nella produzione di alimenti e mangimi;

- Misure di protezione nella produzione.

Infine, viene preteso un protocollo di gestione dei rifiuti rispettosa entro il 2028 e la compilazione quinquennale di report relativi ai progressi da presentare alla Conferenza delle Parti<sup>(42)</sup>.

Sono stati dettati limiti anche in ambito alimentare e dei mangimi mediante Regolamento UE 1259/2011<sup>(43)</sup> e UE 277/2012<sup>(44)</sup>. Questi regolamenti pongono limiti su questi composti, sulla base di studi costantemente in aggiornamento.

## 4 Estrazione

### 4.1 Estrazione liquido-liquido

Entrambe le validazioni sono state eseguite mediante estrazione liquido-liquido. Grazie a questa tecnica è possibile separare i componenti di una soluzione per la loro ripartizione tra due mezzi liquidi immiscibili. Infatti, ad una soluzione viene aggiunto un solvente, tale per cui il soluto sia solubile, in una quantità nota da poter formare due fasi liquide differenti: una rappresentante il solvente estraente e l'altra il liquido diluente. Il soluto sarà presente in quantità elevate nell'estratto. Il trasferimento del soluto può essere favorito mediante reazioni chimiche con il solvente, associando ulteriori operazioni prima dell'estrazione.

L'estrazione liquido-liquido risulta una tecnica da applicare nei casi in cui gli altri metodi di separazione siano poco praticabili, per problemi di bassa volatilità o termolabilità dei componenti singoli, o semplicemente per elevati costi nella procedura in uso.

La ripartizione del soluto è regolata dalla legge di Nerst, la quale indica come “il rapporto tra le attività nelle due fasi sia costante a temperatura costante” mediante la relazione:

$$\frac{[C_1]}{[C_2]} = K$$

In cui  $[C_1]$  rappresenta la concentrazione nella fase liquida 1,  $[C_2]$  la concentrazione nella fase liquida 2 e  $K$  il coefficiente di ripartizione. Questa legge è valida solamente per le soluzioni diluite, assumendo che non ci siano legami tra soluto e solvente<sup>(45)</sup>.

Il solvente viene selezionato secondo criteri che si basano sul coefficiente di ripartizione (il quale deve essere il più alto possibile), su un'estrazione che sia selettiva il più possibile e sulla facilità e semplicità nelle operazioni di estrazione del solvente stesso<sup>(46)</sup>.

Ci possono essere differenti modi in cui può essere condotta una estrazione:

- A singolo stadio;
- A stadi multipli incrociati;
- A stadi multipli in controcorrente.

Nel caso della molteplicità degli stadi, si ha un processo alimentato in continuo con solvente fresco, garantendo un sistema di agitazione tra uno step e l'altro per permettere la separazione delle fasi<sup>(45)</sup>.

In un laboratorio si impiega comunemente un imbuto separatore, accuratamente chiuso con un tappo, il quale viene agitato vigorosamente in modo tale da far entrare in contatto le due fasi liquidi immiscibili. Durante questa operazione il sistema viene fatto sfiatare per permettere di rilasciare eventuali vapori che si formano



all'interno. Successivamente, si lascia la miscela a riposo, per permettere la riequilibrio delle fasi e poter procedere poi con la separazione, aprendo il rubinetto inferiore dell'imbuto e raccogliendo le fasi in due recipienti differenti. La posizione dei solventi è determinata dalle rispettive densità<sup>(46)</sup>.

Nel Laboratorio dove è stato possibile eseguire il lavoro sperimentale, l'estrazione liquido-liquido è stata effettuata all'interno di una bottiglia di vetro permettendo alle due fasi liquide immiscibili il contatto intimo richiesto mediante l'introduzione di una ancorotta magnetica e, di conseguenza, l'applicazione di una intensa agitazione magnetica. L'estratto è stato possibile prelevarlo, dopo una giusta riequilibrio delle fasi, utilizzando una pipetta *pasteur* e trasferendolo in una provetta, in modo tale da poter proseguire con la procedura richiesta. Per facilitare il trasferimento tra una fase e l'altra, prima dell'agitazione si applica un bagno di ultrasuoni di una minima durata, come descritto nella **Sezioni 6.1.4** e **7.1.3** relative alle due validazioni.

## 4.2 Estrazione in fase solida SPE

Il metodo in uso all'interno dell'azienda per l'analisi dei PCB prevede estrazione in fase solida (SPE). È una tecnica di preparazione del campione comune ed utilizzata per l'estrazione di svariate classi di composti chimici<sup>(47)</sup>.

Il processo coinvolge il passaggio di un liquido su un letto solido funzionalizzato, e fa riferimento agli stessi principi della ritenzione in cromatografia liquida: adsorbimento, affinità, esclusione molecolare e scambio ionico<sup>(48)</sup>. La fase solida possiede un'affinità maggiore per il composto da isolare rispetto al solvente nel quale è disciolto. Il campione viene fatto passare attraverso questa fase in modo che gli analiti si raggruppino sulla superficie del materiale adsorbente, a differenza degli altri composti che vengono eluiti senza nessuna interazione<sup>(49)</sup>.

La fase stazionaria viene venduta all'interno di specifiche colonne preconfezionate di polipropilene o teflon con attacco *luer lock* e contenenti setti porosi che trattengono il materiale adsorbente. Queste cartucce esistono in diverse grandezze e con differenti dimensioni delle particelle del materiale di impaccamento. Il più comune impaccamento è 500 mg/6 mL.

I principali materiali utilizzati in SPE sono:

- Adsorbenti naturali: carbone ed allumina;
- Neri di carbone grafitato;
- Resine polimeriche;
- Gel di silice modificati;
- Gel di immunoaffinità;
- Polimeri a stampo molecolare.

Per quanto riguarda i gel di silice derivatizzati, le fasi si suddividono in:

- Superficie polare (fase diretta o normale): i gel trattengono gli analiti mediante interazioni tra gruppi polari. I composti polari sono eluiti con metanolo o miscele di metanolo e tampone acido/basico;
- Superficie apolare (fase inversa): la fase viene legata a gruppi reattivi silanologici della silice mediante un silano contenente dei gruppi reattivi. Il silicio è legato alla fase desiderata e a due gruppi laterali più piccoli;
- Con siti carichi (a scambio ionico): tra gli analiti in cui sono presenti i gruppi carichi e i gruppi funzionali (di carica opposta) del materiale adsorbente si instaurano delle interazioni di scambio ionico.

Nella **Tabella 4.1** sono elencate queste 3 classi di composti.

<b>FASI NON POLARI</b>		
<b>C18</b>	Octadecil	Si C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>
<b>C8</b>	Octil	Si C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>
<b>C2</b>	Etil	Si C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
<b>CH</b>	Cicloesil	Si C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>
<b>PH</b>	Fenil	Si C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
<b>FASI POLARI</b>		
<b>CN</b>	Cianopropil	Si CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
<b>2OH</b>	Diolo	Si CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> OH
<b>SI</b>	Silica	Si OH
<b>NH<sub>2</sub></b>	Amminopropil	Si CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>
<b>FASI DI SCAMBIO IONICO</b>		
<b>PRS</b>	Solfonilpropil	Si CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>
<b>CBA</b>	Carbossimetil	Si CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>
<b>DEA</b>	Dietilamminopropil	Si CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>SAX</b>	Trimetilamminopropil	Si CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>

Tabella 4.1, Fasi adsorbenti delle cartucce SPE<sup>(50)</sup>

L'impiego della tecnica SPE si sviluppa su più fasi. Il primo riguarda l'attivazione del materiale adsorbente con il passaggio di pochi mL di solvente, generalmente MeOH, seguito da H<sub>2</sub>O. La fase stazionaria non deve mai andare a secco. Al termine dell'attivazione viene caricato il campione alla velocità di 10 mL/min. In colonna si ha un trattenimento selettivo degli analiti secondo la polarità delle specie in gioco. Infine, si attende che le cartucce si asciugino e si effettua l'eluizione degli analiti trattenuti con circa 10 mL di solvente polare o apolare<sup>(51)</sup>. Il solvente è poi concentrato a piccolo volume per l'iniezione GC.

Nonostante i numerosi vantaggi che porta l'utilizzo dell'estrazione SPE, essa è una tecnica impegnativa operativamente e non del tutto standardizzabile e che pertanto richiede un forte impegno di risorse in un laboratorio che affronta grossi quantitativi di analisi al giorno. Ogni giorno vengono preparati *batch* analitici da 20 campioni, che subiscono la procedura appena descritta. Il tempo richiesto per il caricamento del campione è di circa 50 minuti, mentre il tempo di asciugatura va dalle 3 alle 4 ore. Infine, oltre al costo di 3 euro per cartuccia, si hanno interferenze in ECD dovute al rilascio di impurezze del PTFE. L'insieme di queste colonnine preformate ha uno spurgo, che può rendere difficoltoso raggiungere il limite di rivelazione obiettivo di 0,001 mg/L.

## 5 Validazione di un metodo analitico

La validazione secondaria di un metodo analitico prevede il confronto delle principali caratteristiche metrologiche ottenute in laboratorio con le medesime caratteristiche tabulate nel metodo normato. Sono requisiti importanti per l'attività di un laboratorio, in quanto gli garantisce un livello di competenza necessario per presentare risultati affidabili e idonei. Di conseguenza, devono essere convalidate le prestazioni del metodo e stimate le incertezze del risultato, secondo modalità riconosciuta, coerente e semplice da interpretare.

Si ricorre alla validazione anche per dimostrare l'equivalenza di risultati ottenuti tramite due metodi differenti: per esempio uno sviluppato recentemente e uno già esistente<sup>(52)</sup>.

### 5.1 Lo sviluppo di un metodo

La fase di sviluppo di un metodo può assumere differenti modalità a seconda se il progetto parta da idee o dall'adattamento di un metodo già esistente. Nel primo caso si parla di metodo interno e si ricorre a tutta l'esperienza e la competenza per progettare una procedura idonea. Nel secondo caso, invece, il laboratorio adotta una procedura validata pubblicata in una norma su cui il laboratorio dovrà verificare la sua competenza nell'applicazione del metodo stesso.

Ai fini della validazione di un metodo ci si può avvalere anche delle prove inter-laboratorio organizzate da Enti terzi ed Accreditati

Il processo di validazione di un metodo comincia nel momento in cui un cliente pone uno specifico problema da risolvere ad un laboratorio. Quest'ultimo deve definire i requisiti analitici che servono a determinare le caratteristiche di prestazione, verificando, innanzitutto, se vi sono metodi adeguati o se si necessita svilupparne uno. Di conseguenza, vengono definite le caratteristiche di prestazione e si valuterà se il metodo risulta adatto allo scopo o meno: in caso contrario servirà sviluppare ulteriormente il processo<sup>(52)</sup>.

## 5.2 Caratteristiche di prestazione di un metodo

Il protocollo di validazione e i relativi risultati seguono precise linee guida ed i requisiti minimi sono dettati dagli enti di accreditamento nazionali, dal metodo normato o in mancanza dal laboratorio stesso.

I metodi statistici sono di fondamentale importanza, utili nell'analisi delle caratteristiche di prestazione mediante l'utilizzo di parametri.

I parametri di validazione sono:

- Selettività
- LOD
- LOQ
- Intervallo di misura
- Sensibilità
- Accuratezza
- Precisione
- Robustezza

La *Selettività* è “la capacità di determinare inequivocabilmente l'analita con il livello di accuratezza prefissato in presenza di altri componenti che possono essere presenti nel campione da esaminare”, riferita alla possibilità di definire un singolo analita o una classe nella matrice posta in esame senza interferenze<sup>(53)</sup>.

*LOD*, *limit of detection* o *MDL*, è la concentrazione in cui si ha il 99 % di probabilità che la risposta cromatografica non sia imputabile al rumore di fondo. Si calcola estraendo sette bianchi dal metodo e sette prove alla minima concentrazione riconoscibile. Quindi si calcola:

$$LOD = 3,14 * SD$$

Dove *SD* è la deviazione standard delle sette repliche e il valore 3,14 corrisponde al coefficiente *t* per sei gradi di libertà<sup>(54)</sup>.

*LOQ*, *limit of quantification*, è il livello più basso a cui si possa associare una incertezza accettabile. Di una serie di misure ripetute di campioni bianchi o di campioni di prova con basse concentrazioni di analita, si calcolano innanzitutto  $s_0$  e  $s'_0$ , e successivamente il *LOQ* come:

$$LOQ = k_Q * SD$$

dove  $k_Q$  è un fattore moltiplicativo definito dalla IUPAC di valore 10. Se lo scarto risulta essere costante a basse concentrazioni, il moltiplicatore corrisponde ad uno scarto tipo relativo (RSD, *Relative Standard Deviation*) del 10%<sup>(52)</sup>.

L'*Intervallo di Misura* è un intervallo per cui il metodo fornisce risultati con una incertezza accettabile. Il LOQ definisce l'estremo inferiore di questo campo, mentre l'estremo superiore è scelto in funzione del progetto e/o delle caratteristiche del detector.

La *Sensibilità Analitica* è la variazione della risposta dello strumento quando la grandezza misurata cambia. Nella curva di taratura rappresenta la pendenza della retta<sup>(52)</sup>.

L'*Accuratezza* “esprime il grado di accordo tra il valore medio ottenuto partendo da un grande insieme di risultati di prova e un valore di riferimento considerato reale”. Viene valutata negli effetti sistematici e causali sui singoli risultati, mediante la determinazione della percentuale di recupero (R %).

$$R \% = \frac{\text{concentrazione sperimentale}}{\text{concentrazione teorica}} * 100$$

I criteri di accettabilità per la percentuale di recupero sono differenti a seconda della complessità del metodo e delle concentrazioni di analita che devono essere determinate.

Successivamente i recuperi vengono trattati per ogni livello di concentrazione scelto nella validazione<sup>(53)</sup>, mediante relazione:

$$\bar{R} \% = \frac{\sum R \% \text{ singolo}}{\text{Numero di ripetute}}$$

La *Precisione* viene studiata mediante tre parametri: scarto tipo di ripetibilità, scarto tipo di riproducibilità e precisione intermedia. Con termine ripetibilità si viene a indicare la variabilità, all'interno del laboratorio stesso, dei processi studiati dallo stesso operatore utilizzando le stesse apparecchiature, in un breve periodo di tempo. La riproducibilità, invece, viene esaminato mediante una collaborazione tra diversi laboratori che analizzano lo stesso campione, impiegando operatori e apparecchiature differenti. Infine, la precisione intermedia riguarda la variazione dei risultati nel momento in cui vengono modificati tutti i fattori appena descritti. La precisione è fondamentale per il calcolo dell'incertezza globale<sup>(55)</sup>.

La *Robustezza* è la capacità di un metodo analitico di non essere influenzato da piccole variazioni nei differenti parametri, studiando gli effetti che potrebbero derivarne sulle prestazioni. Fornisce, dunque, una indicazione di affidabilità del metodo nell'uso quotidiano. Viene considerata in fase di sviluppo unicamente nel caso di metodi interni<sup>(56)</sup>.

## 6 OTC – Parte sperimentale

### 6.1 Metodo sviluppato

Il metodo normato, da cui è partito lo studio sperimentale, fa riferimento alla norma europea UNI EN ISO 17353:2006<sup>(57)</sup>, la quale descrive la determinazione qualitativa e quantitativa di composti organici e/o cationi dello stagno in acque superficiali, sotterranee e di scarico.

#### 6.1.1 Sostanze utilizzate

*Eptano* (Sigma-Aldrich)<sup>(58)</sup>: C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>, liquido incolore, impiegato come solvente di estrazione per i composti organostannici.

*Acido Acetico*<sup>(59)</sup>: CH<sub>3</sub>COOH, liquido incolore, impiegato per acidificare e portare il pH ad un valore di 4-4,5. All'inizio del lavoro sperimentale sono stati effettuati test per quantificare l'aggiunta di acido acetico. Mediante addizione di 200 µL il valore di pH si sistemava pH.

*Solfato di Sodio* (Sigma-Aldrich)<sup>(60)</sup>: Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, solido bianco inodore, impiegato come anidrificante. Precedentemente anidrificato in stufa a 130 °C per 2 ore.

*Sodio Tetraetilborato*<sup>(61)</sup>: NaBEt<sub>4</sub>, solido bianco inodore, usato come agente derivatizzante al 4 % in H<sub>2</sub>O.

*Florisil* (Sigma-Aldrich): solido bianco, costituito dall'84 % di biossido di silicio, il 15 % di ossido di magnesio e 1 % di solfato di sodio. È un silicato di magnesio (MgO:XSiO<sub>2</sub>\*H<sub>2</sub>O) impiegato nelle colonne di purificazione. Viene pretrattato per l'attivazione e l'anidificazione.

*Acetato di sodio* (Sigma-Aldrich)<sup>(62)</sup>: C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na, solido incolore inodore, impiegato per la preparazione della soluzione tampone.

*Soluzione multicomponente, Stock Solution A*<sup>(63)</sup>: preparato commerciale contenente cationi organostannici in metanolo (**Tabella 6.1**), richiesto dalla norma ISO 17353:2006, impiegato come mix LCS OTC a 1 mg/L, ottenuto diluendo 10 µL di Stock Solution A (1000 a µg/L Ultra Scientific) in 5 mL di acetone in un matraccio tarato da 10 mL e portando successivamente a volume.

Analiti
Monobutyltin trichloride
n-Octyltin trichloride

di-n-Butyltin dichloride
di-n-octyltin dichloride
Tetrabutyltin
Triphenyltin chloride
Tricyclohexyltin chloride
Tributyltin chloride

*Tabella 6.1, Analiti Stock Solution A*

*Soluzione multicomponente, Stock Solution B<sup>(64)</sup>*: preparato commerciale contenente cationi organostannici in metanolo (**Tabella 6.2**), richiesto dalla norma ISO 17353:2006, impiegato come surrogato OTC a 1 mg/L, ottenuto diluendo 10 µL di Stock Solution B (1000 a µg/L Ultra Scientific) in 5 mL di acetone in un matraccio tarato da 10 mL e portando successivamente a volume.

<b>Analiti</b>
Tri-n-Propyltin chloride
n-Heptyltin trichloride
Tetra-n-propyltin
di-n-Heptyltin dichloride

*Tabella 6.2, Analiti Stock Solution B*

*Soluzione multicomponente, Stock Solution C<sup>(65)</sup>*: preparato commerciale contenente cationi organostannici in metanolo (**Tabella 6.3**), richiesto dalla norma ISO 17353:2006, impiegato come ISTD OTC a 5 mg/L, ottenuto diluendo 50 µL di Stock Solution C (1000 a µg/L Ultra Scientific) in 5 mL di acetone in un matraccio tarato da 10 mL e portando successivamente a volume.

<b>Analiti</b>
Tetrapentyltin

*Tabella 6.3, Analiti Stock Solution C*

*Modificatore di matrice<sup>(66)</sup>*: preparato commerciale, si presenta in sospensione acquosa a base di cloruro di calcio diidrato, impiegato per modificare la viscosità della matrice e simulare, conseguentemente, una matrice di scarico.

### 6.1.2 Apparecchiature utilizzate

*Vetreria da laboratorio*: pipette *pasteur*, becker, matracci, provette, vial di vetro da 60 mL, vial da autocampionatore.

*Dosatori per solventi*: dosatori automatici con volume regolabile, inseriti nelle bottiglie dei solventi.



*Microsiringhe (Agilent):* impiegate per prelevare volumi di liquidi nell'intervallo 1-10 µL.

*Micropipette (Agilent):* impiegate per prelevare volumi di liquidi nell'intervallo 10-5000 µL.

*Bilancia analitica:* impiegata per pesare i campioni di validazione all'inizio della procedura sperimentale.

*Bagno ad ultrasuoni VWR Ultrasonic Cleaner USC-TH:* impiegato per favorire il contatto intimo tra le fasi durante la fase di estrazione.

*Scuotitore Multireax Heidolph:* impiegato per favorire la derivatizzazione dopo l'aggiunta dell'agente derivatizzante e dell'agente estraente, ad una velocità regolabile mantenuta a 800 rpm.

*GC-MS/MS Agilent Technologies:* mediante cromatografia si separano le miscele di composti per l'individuazione delle singole componenti. Un gascromatografo effettua la separazione tramite tre principali step: iniezione del campione in esame, separazione nei singoli componenti e rivelazione per identificare le parti separate. Le colonne GC sono localizzate all'interno di una camera a temperatura controllata. Un estremo di queste è collegato al sistema di iniezione, mentre l'altro estremo è interfacciato al rivelatore mediante *transfer line*. Quest'ultima viene impiegata per la transizione dalla pressione atmosferica della colonna a quella di alto vuoto del rivelatore, necessaria per limitare gli impatti tra molecole e ioni. Come analizzatore di massa è stato impiegato un triplo quadrupolo, il quale è costituito in sequenza da un quadrupolo, una cella di collisione e un altro quadrupolo. L'introduzione delle ultime due parti, rispetto ad un normale quadrupolo, permette di ottenere una migliore identificazione degli analiti presenti proprio in virtù di una migliore frammentazione della molecola.

### **6.1.3 Matrici in esame: acqua potabile, sotterranea e di scarico**

Il lavoro sperimentale si è basato sullo studio di differenti matrici: acqua potabile, sotterranea e di scarico.

I corpi idrici sotterranei intendono gli accumuli di acqua meteorica contenuti nel sottosuolo nella zona di saturazione a diretto contatto con matrice rocciosa. In questa categoria si considerano falde freatiche e profonde situate in formazioni permeabili, e delle masse d'acqua intrappolate con una velocità di flusso bassa se non addirittura nulla.

Con acqua di scarico si intende qualsiasi immissione effettuata mediante “sistema stabile di collettamento che collega senza risoluzione di continuità di ciclo di produzione del refluo con il corpo ricettore”<sup>(67)</sup>.

L'acqua reflua si suddivide, a sua volta, in urbana e industriale, a seconda se la provenienza è di tipo domestico o commerciale. Inoltre, si può parlare di scarico continuo, discontinuo o accidentale. Continuo riferito ad uno scolo prolungato che permane per tutto il tempo; discontinuo per un rilascio intermittente di breve durata, e accidentale nel caso in cui lo scarico sia dovuto a motivi di natura differenti come inconvenienti o disservizi<sup>(67)</sup>.

### 6.1.4 Procedura sperimentale

La procedura di seguito riportata si basa sulla normativa UNI EN ISO 17353:2006<sup>(57)</sup>, relativa alla determinazione di composti organici dello stagno.

Il metodo sviluppato in questo lavoro sperimentale si basa su un'estrazione liquido-liquido mediante addizione di un solvente organico immiscibile in acqua. La normativa di riferimento prevedeva l'impiego di esano. Visti gli effetti tossici acuti e cronici a cui l'esano porta<sup>(68)</sup> con l'uso quotidiano e prolungato, il Laboratorio impiega l'eptano, il quale presenta dei rischi ridotti.

Per procedere con le prove di calibrazione e validazione del metodo sono state utilizzate aliquote da 50 mL di acqua prelevata da fonti differenti a seconda della matrice da validare. Per quanto riguarda l'acqua potabile è stata presa in studio l'acqua Levissima. Come riferimento a quella sotterranea è stata prelevata l'acqua proveniente dal rubinetto del laboratorio e, infine, come acqua di scarico si è fatto riferimento all'acqua di rubinetto con successiva addizione di modificatore di matrice, ai fini di aumentare la salinità dell'acqua. Le aliquote sono state prelevate e trasferite in vial di vetro da 60 mL.

Preliminarmente sono state effettuate due prove comparando l'esecuzione del metodo così come previsto dalla norma con una microestrazione, tecnica che il Laboratorio già applica per la determinazione degli OTC in campioni terrosi, la quale consente di maneggiare volumi minori con tempistiche ottimali.

Il metodo UNI EN ISO 17353:2006<sup>(57)</sup> prevede i seguenti passaggi:

- Preparazione della soluzione tampone acetata;
- Prelievo di 10 mL della soluzione e trasferimento nella bottiglia contenente 1 L di campione di acqua
- Agitazione ed eventuale correzione del pH (4,5);
- Addizione di 1 mL di surrogato (Stock Solution B, **Sezione 6.1.1**) e LCS (Stock Solution A, **Sezione 6.1.1**), con successiva agitazione magnetica;
- Derivatizzazione della soluzione con 5 mL di agente derivatizzante e addizione di 20 mL di esano;
- Agitazione, estrazione e addizione di 2 g di solfato di sodio;
- Purificazione dell'estratto;
- Riduzione del volume della fase organica a 1 mL.

Ai fini di identificare la migliore procedura sono state svolte due prove.

La prima prevedeva l'impiego di una soluzione tampone acetata. Essa è stata preparata dissolvendo 1 mol di acetato di sodio triidrato in 50 mL di acqua potabile, con successiva addizione di acido acetico in modo tale da ottenere un valore di pH di 4,5. È stata effettuata una basificazione per poter determinare la quantità di soluzione tampone da aggiungere al campione acquoso. Sono state preparate, quindi, dieci vial ognuna contenente 50 mL di acqua potabile e sono stati eseguiti dieci *spike* differenti di soluzione tampone, come riportato in **Tabella 6.4**.

Identificazione	TAMP 1	TAMP 2	TAMP 3	TAMP 4	TAMP 5	TAMP 6	TAMP 7	TAMP 8	TAMP 9	TAMP 10
Soluzione tampone acetata addizionata [ $\mu\text{L}$ ]	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550

Tabella 6.4, Quantità differenti di soluzione tampone

Successivamente si sono svolti i seguenti passaggi:

- Agitazione manuale;
- Aggiunta di 100  $\mu\text{L}$  di surrogato e 100  $\mu\text{L}$  di LCS;
- Sonicazione con bagno ad ultrasuoni per 30 minuti;
- Derivatizzazione: addizione di sodio tetraetilborato al 4% in  $\text{H}_2\text{O}$  e 2,5 mL di eptano;
- Agitazione vigorosa mediante l'impiego dello scuotitore *Multireax Heidolph* ad una velocità di 800 rpm per 45 minuti;
- Estrazione della fase organica mediante prelievo con pipetta *pasteur* con trasferimento su colonna  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ /silice;
- Trasferimento in dieci vial autocampionatore, ciascuna delle quali identificata mediante etichetta con numero progressivo;
- Addizione di 10  $\mu\text{L}$  di standard interno (*Stock Solution C*, **Sezione 6.1.1**).

La seconda prova è stata effettuata senza l'utilizzo della soluzione tampone, acidificando il campione acquoso con 200  $\mu\text{L}$  di acido acetico, derivatizzando, estraendo e purificando l'estratto con colonna  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ /silice per verificare la stabilità del sistema estrattivo.

L'analisi strumentale mediante GC-MS/MS delle due prove ha evidenziato come la tecnica della microestrazione in ambiente acido fornisca recuperi idonei con un profilo cromatografico superiore. Nelle **Figure 6.1 e 6.2** si può notare la relativa differenza.

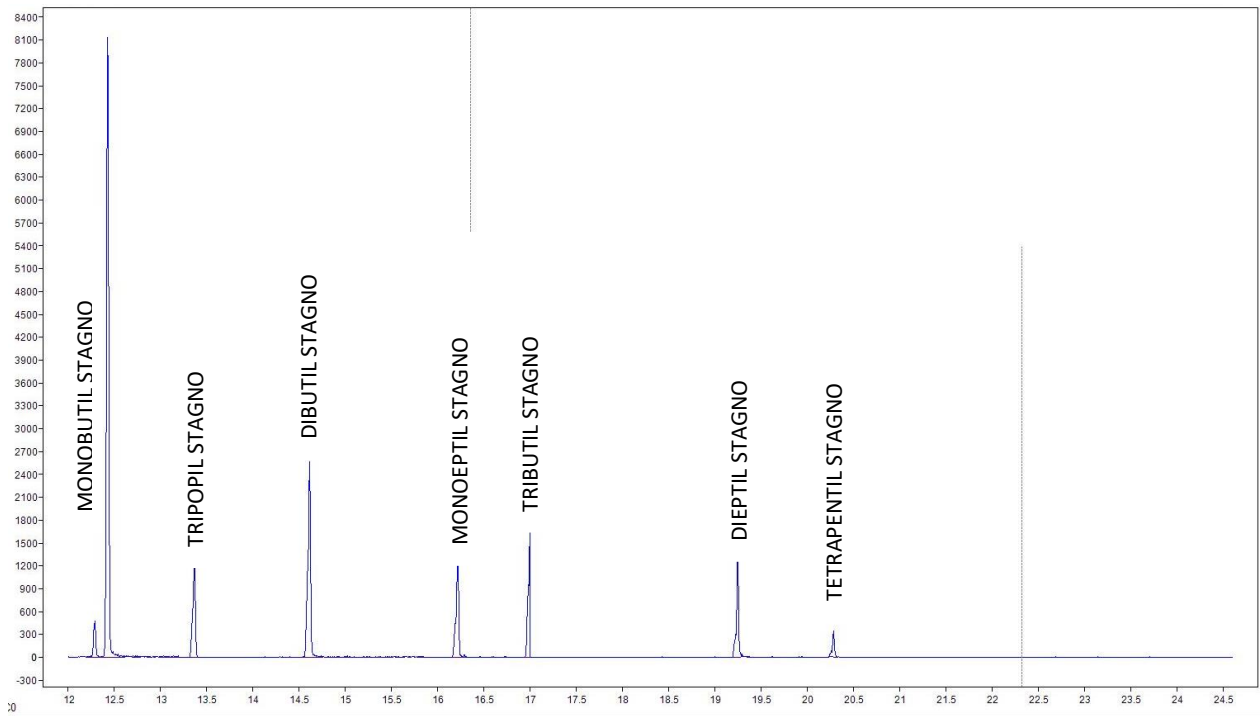


Fig. 6.1, Cromatogramma prova senza soluzione tampone

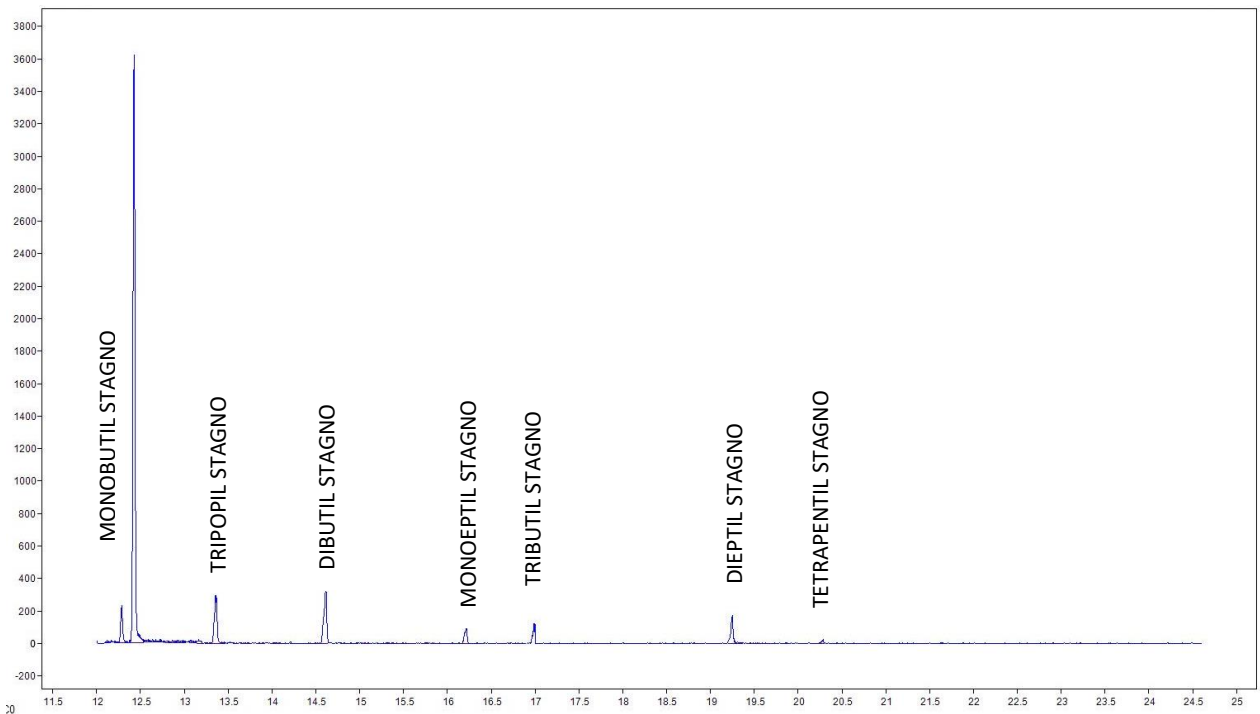


Fig. 6.2, Cromatogramma prova con soluzione tampone

A questo punto, sono state eseguite le prove di validazione nelle tre differenti matrici a tre livelli di concentrazione differenti, ciascuna studiata in *batch* da 11 campioni, numero ottimale per un corretto confronto di ripetibilità (vedi **Capitolo 5**), impiegando la procedura scelta.

### 6.1.5 Analisi strumentale

L'analisi è basata sulla separazione cromatografica seguita da rilevamento mediante spettrometria di massa (MS).

Per lo studio di questi composti è stato impiegato un gascromatografo *Agilent Technologies 7890A GC System* provvisto di autocampionatore *Agilent Technologies 7653A Automatic Sampler* programmabile con un software.

L'iniezione avviene in modalità *Pulsed Splitless*, ovvero mediante una iniezione completa e rapida, con volume di prelievo pari a 3,0  $\mu\text{L}$  ( $T = 280\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). La modalità di iniezione prevede un aumento di pressione del gas carrier, in questo caso Elio, flussato a 1,4 mL/min.

La colonna utilizzata è *Agilent Technologies HP – 5MS UI*, colonna capillare di dimensioni 30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ .

In **Tabella 6.5** sono riassunti i parametri relativi al metodo cromatografico.

Parametri	Settaggio
Colonna	<i>Agilent Technologies HP – 5MS UI</i>
Dimensioni	30 m x 250 $\mu\text{m}$ x 0,25 $\mu\text{m}$
T iniziale colonna	50 $^{\circ}\text{C}$
Flusso colonna	1,4 mL/min
Iniezione	<i>Pulsed Splitless</i>
Pressione di iniezione	30 psi x 0,7 min
Volume iniettato	3,0 $\mu\text{L}$

Tabella 6.5, Parametri sistema iniezione e colonna

Il forno, nel quale è inserita la colonna, ha una rampa di temperatura (**Tabella 6.6 – Figura 6.3**):

	$^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Valore [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Holding Time [min]
<b>Iniziale</b>	-	50	0,6
<b>1</b>	10	180	0
<b>2</b>	20	300	5

Tabella 6.6, Rampa di temperatura forno gascromatografo

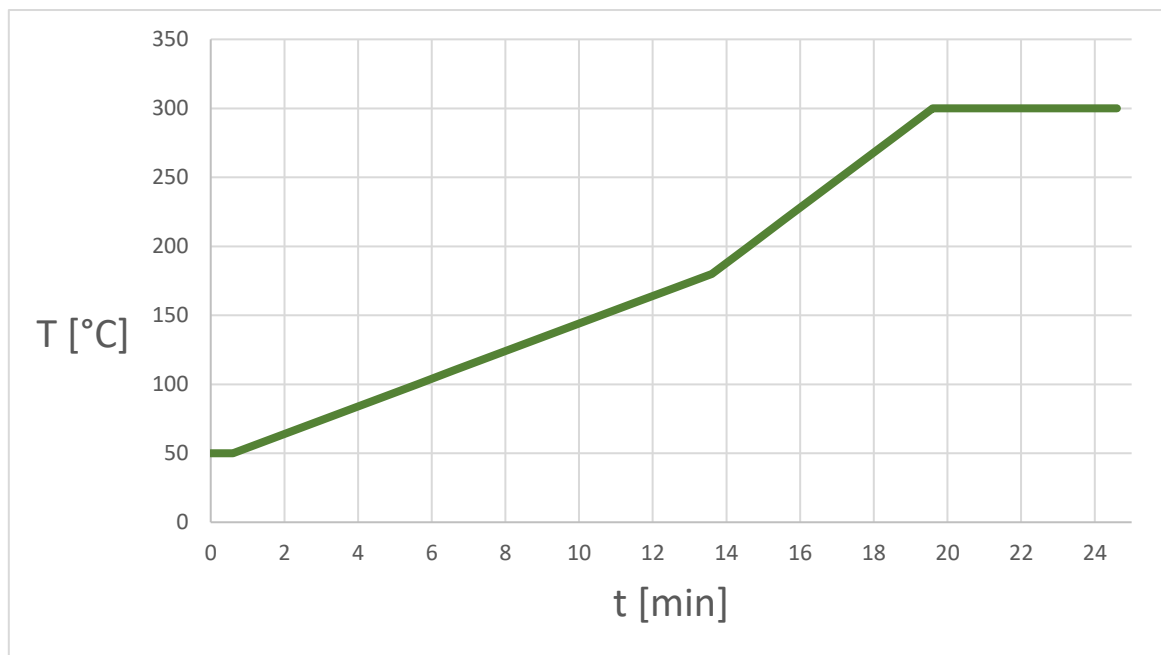


Fig. 6.3, Rampa di temperatura forno gascromatografo

Al termine della eluizione in colonna, i vari analiti giungono al detector *Agilent Technologies 7000AGC/MS Triple Quad* (T 300 °C).

I campioni reali sono mandati a prova in *batch*, ovvero un quantitativo di campioni, corrispondente ad un massimo di 20, simili tra loro per matrice e processati impiegando lo stesso processo nello stesso momento. Per ogni *batch* viene preparato e caricato un controllo di calibrazione strumentale all'inizio e alla fine dell'analisi, chiamato CCV (*Continuing Calibration Verification*). Questo controllo viene effettuato a metà della curva di calibrazione, in particolare al punto 3 della curva di taratura (vedi **Tabella 6.7**).

Per ogni *batch*, inoltre, si preparano dei controlli preparativi quali MB (*Method Blank*), LCS (*Laboratory Control Sample*) e LCSD (*Laboratory Control Sample Duplicate*, se richiesto). Il primo in questione è un campione preparato solo in matrice pulita (acqua Levissima) seguendo tutte le fasi previste dalla procedura operativa, in modo tale da visualizzare eventuali contaminazioni. LCS, invece, consiste nella preparazione di campioni sempre in matrice pulita di acqua Levissima nella quale si introducono gli analiti a concentrazione nota. Per il metodo in esame viene aggiunto il *MIX LCS OTC* relativo alla soluzione multicomponente *Stock Solution A* (vedi **Sezione 6.1.1**). Successivamente vengono eseguiti tutti gli step previsti dalla procedura sperimentale. Questo tipo di controllo serve a monitorare la performance del laboratorio. Infine, LCSD, viene preparato per ottenere informazioni riguardanti la ripetibilità.

## 6.2 Risultati, discussione e confronto tra le differenti matrici

Vengono di seguito riportati i risultati relativi alla calibrazione e alla validazione del metodo in esame, applicato per le tre differenti matrici descritti nella **Sezione 6.1.3**.

Per ognuna delle matrici studiate è stata, innanzitutto, costruita una retta di taratura e, successivamente, eseguita la validazione sperimentale.

### 6.2.1 Calibrazioni

La calibrazione segue il metodo dello standard interno, basandosi su un confronto tra le risposte dello strumento relativo ai composti target e le risposte di altri standard addizionati in quantità standard al sistema prima dell'iniezione. Di conseguenza, la risposta del composto target viene normalizzata alla risposta dello standard interno utilizzato.

La retta di calibrazione per questo metodo è stata eseguita preparando 6 vial da 40 mL ognuna etichettata e identificata con un numero progressivo relativo ai sei punti di calibrazione. All'interno delle vial sono stati inseriti 20 mL di acido acetico e sono stati eseguiti differenti *spike* delle soluzioni multicomponenti *stock solution* A e B precedentemente preparate in acetone. Di seguito si riporta in **Tabella 6.7** le differenti quantità *spikate* per ogni punto.

Punti di calibrazione	Concentrazione dei punti di calibrazione [µg/L]	Spike Stock Solution A a 1 mg/L [µL]	Spike di Stock Solution B a 1 mg/L [µL]
Cal 1	1	20	100
Cal 2	2,5	50	100
Cal 3	5	100	100
Cal 4	10	200	100
Cal 5	15	300	100
Cal 6	25	500	100

Tabella 6.7, Punti di Calibrazione

Una volta effettuati gli *spike* è stata eseguita la parte di preparativa descritta nella **Sezione 6.1.4**, ottenendo l'estratto finale da analizzare. I sei estratti recuperati sono stati iniettati nel GC-MS/MS e i cromatogrammi sono stati successivamente analizzati.

Si riportano, di seguito, i cromatogrammi dei differenti livelli di concentrazione (**Figure 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8 e 6,9**).

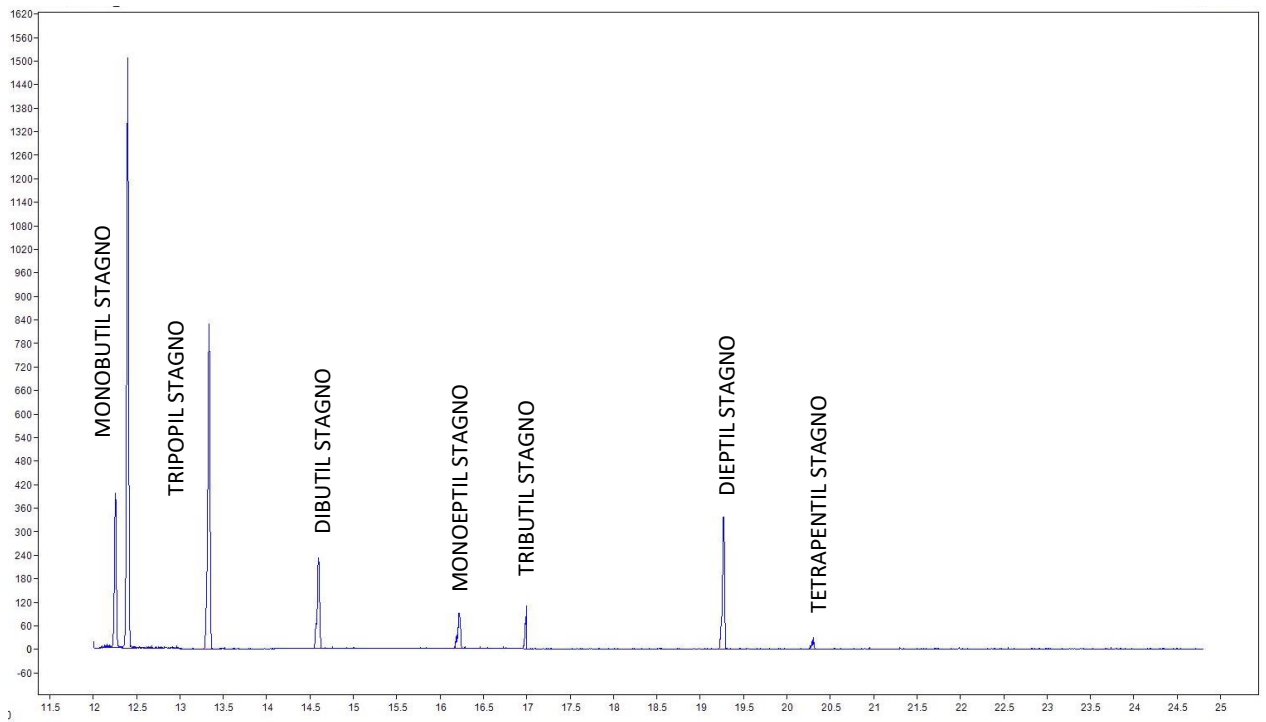


Fig. 6.4, Cromatogramma punto di calibrazione 1

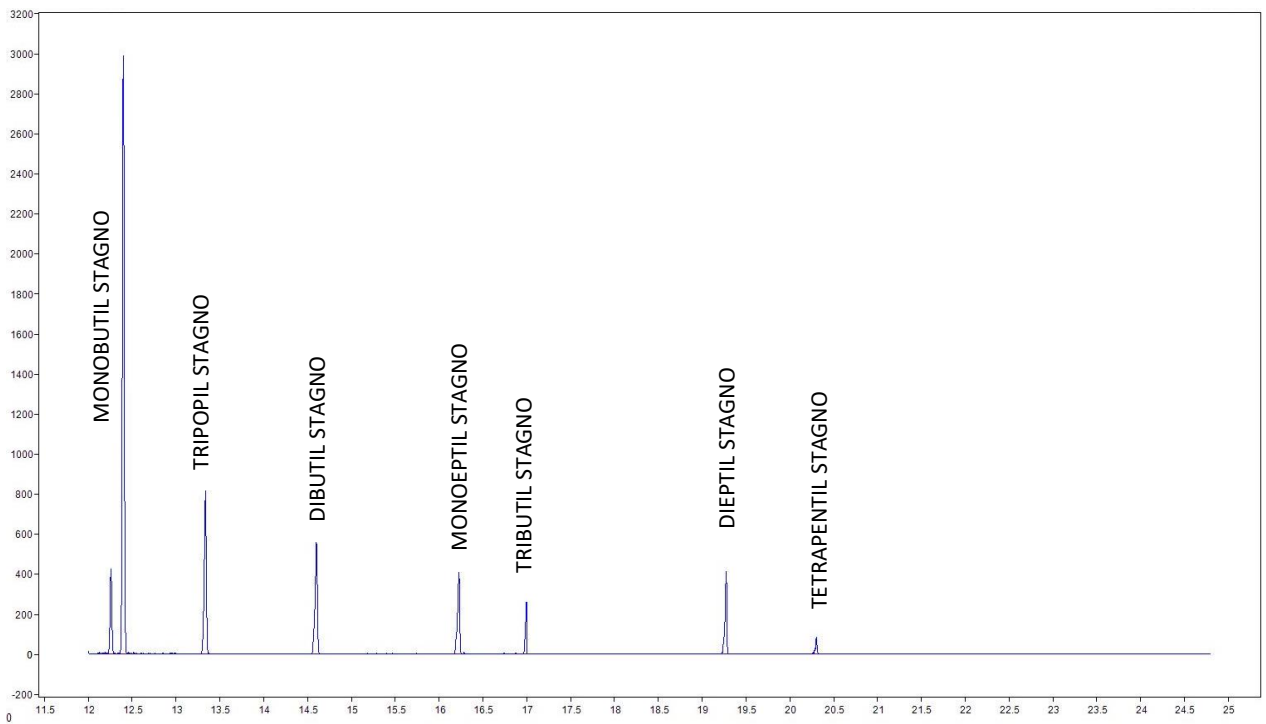


Fig. 6.5, Cromatogramma punto di calibrazione 2



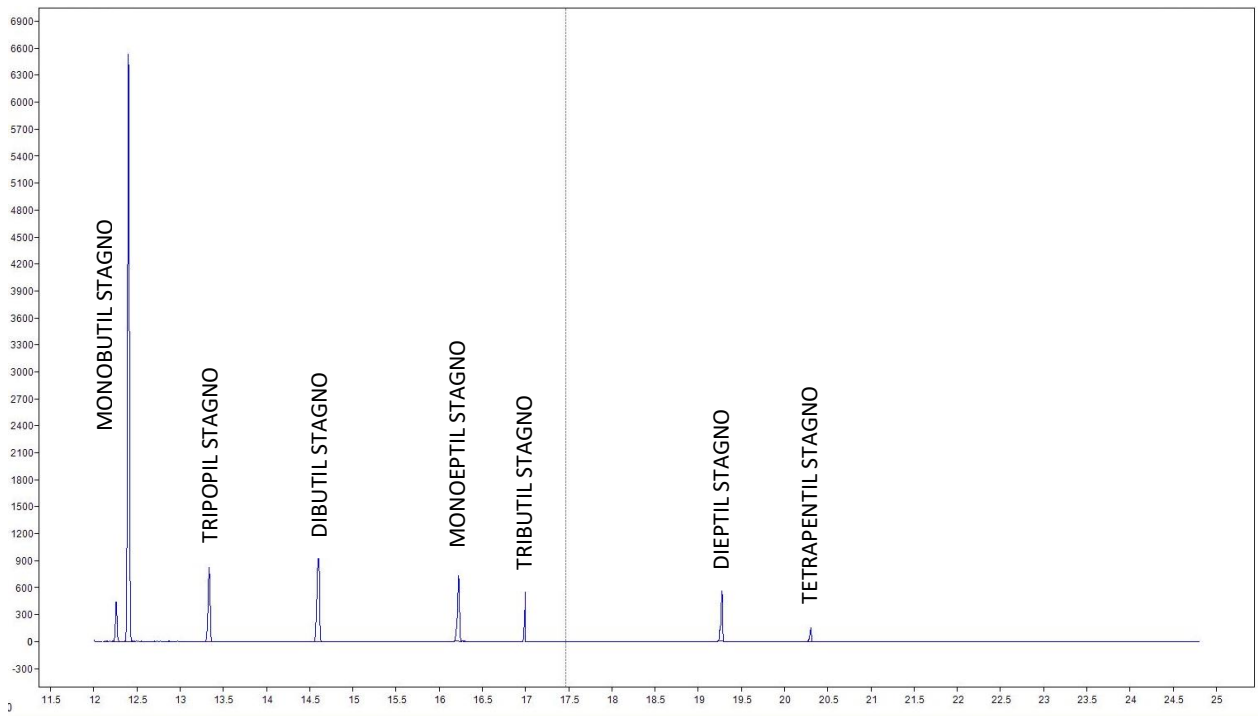


Fig. 6.6, Cromatogramma punto di calibrazione 3

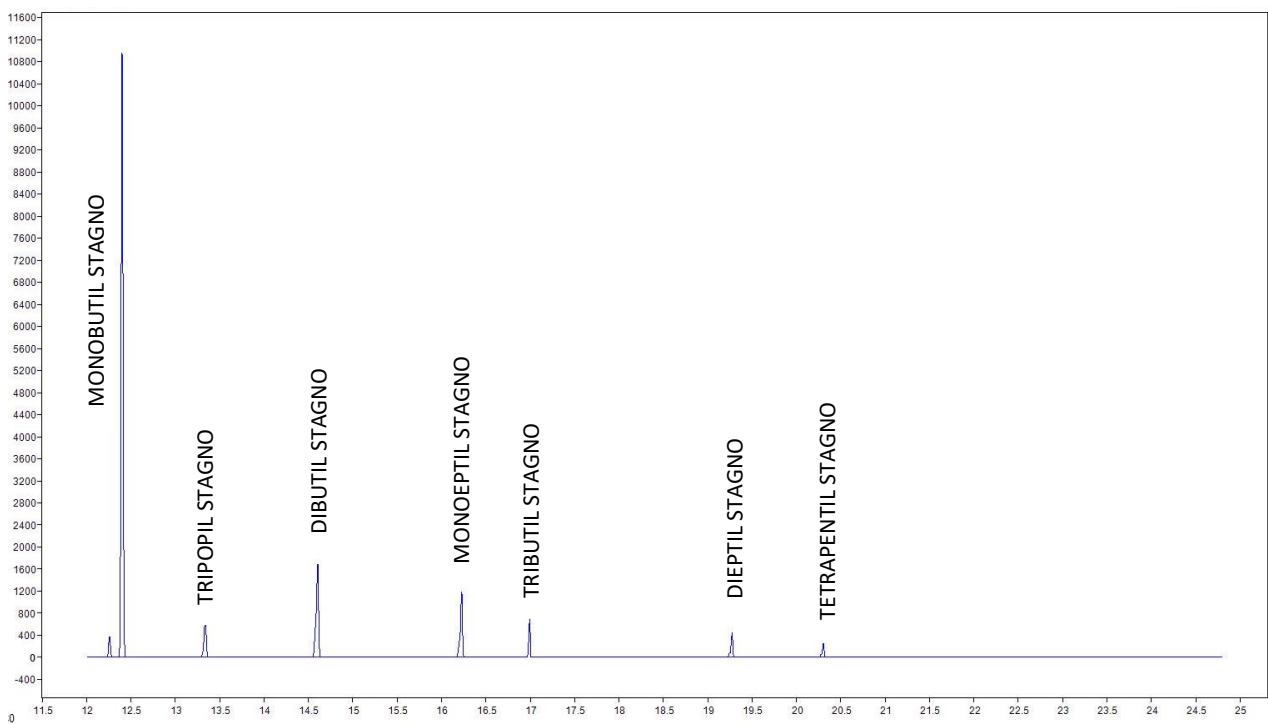


Fig. 6.7, Cromatogramma punto di calibrazione 4

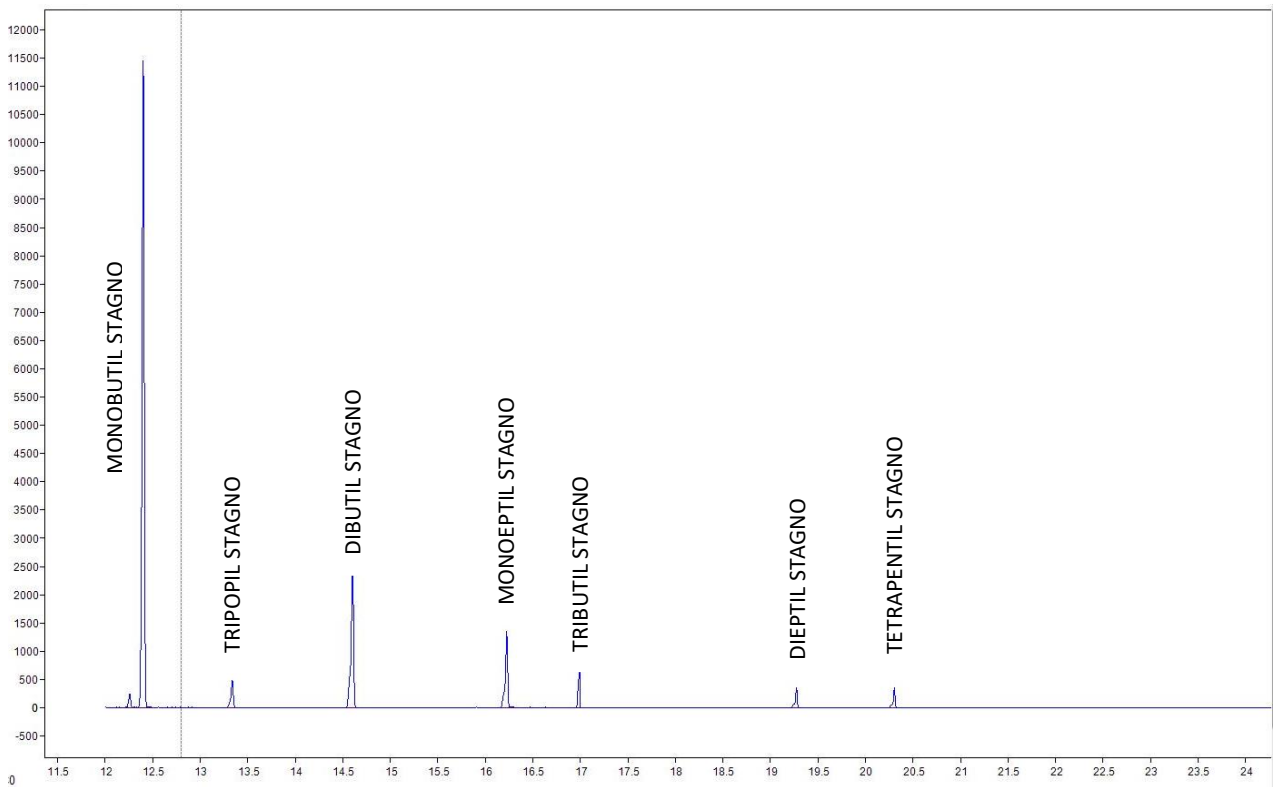


Fig. 6.8, Cromatogramma punto di calibrazione 5

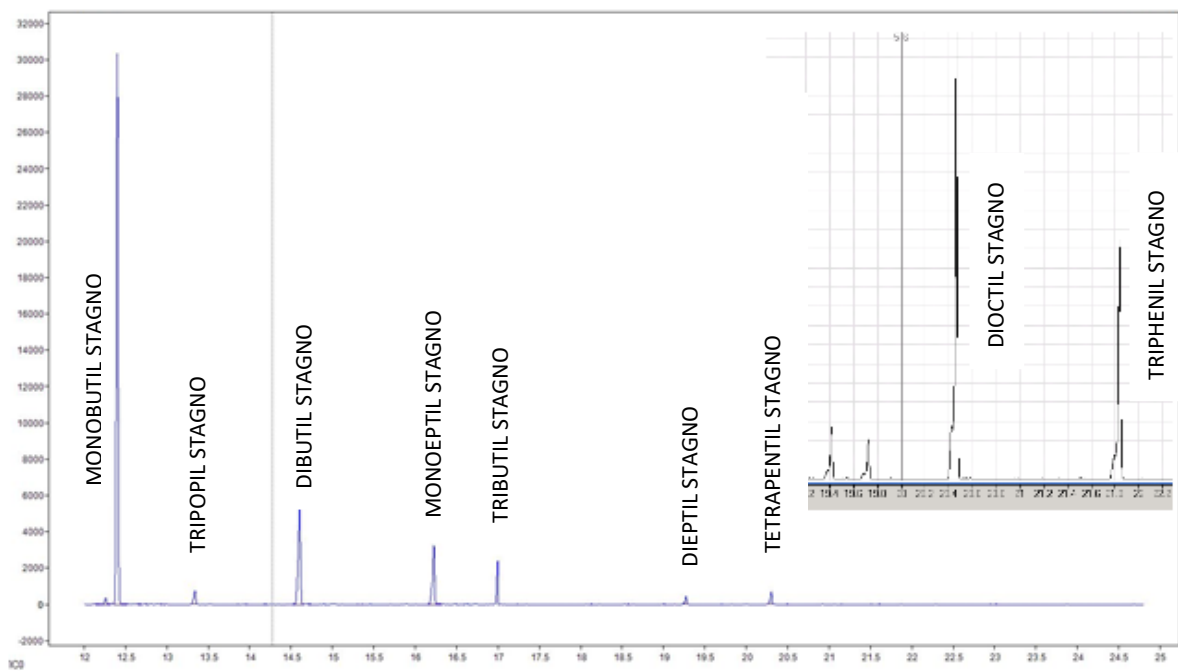


Fig. 6.9, Cromatogramma punto di calibrazione 6

La calibrazione è stata effettuata con tre punti caratteristici singoli dei differenti Aroclor esaminati. Si riportano in seguito i risultati delle integrazioni e le relative curve di calibrations di un punto per ciascun analita target (**Tabella 6.8**).

Punti di calibrazione	Concentrazione dei punti di calibrazione [ $\mu\text{g/L}$ ]	Area				
		MBT	DBT	TBT	DOT	TPhT
Cal 1	1	69,22871	169,8003	187,6003	290,0428	239,2051
Cal 2	2,5	197,0858	436,8842	470,6322	870,5828	576,6786
Cal 3	5	343,4174	788,983	904,9922	1717,777	1056,047
Cal 4	10	588,0723	1413,631	1514,559	2987,582	1979,376
Cal 5	15	947,697	2180,61	2522,821	4862,256	3167,142
Cal 6	25	1586,53	3852,075	4369,129	7830,945	5519,827

Tabella 6.8, Risultati di integrazione della calibrazione degli analiti target

Le relative curve di calibrazione si ottengono mettendo nell'asse delle ascisse la concentrazione e nell'asse delle ordinate l'area calcolata (**Figure 6.10, 6.11, 6.12, 6.13 e 6.14**). L'interpolazione lineare è stata forzata a zero, come descritto dal metodo EPA 8000D<sup>(69)</sup>, per limitare il *bias* a concentrazioni basse.

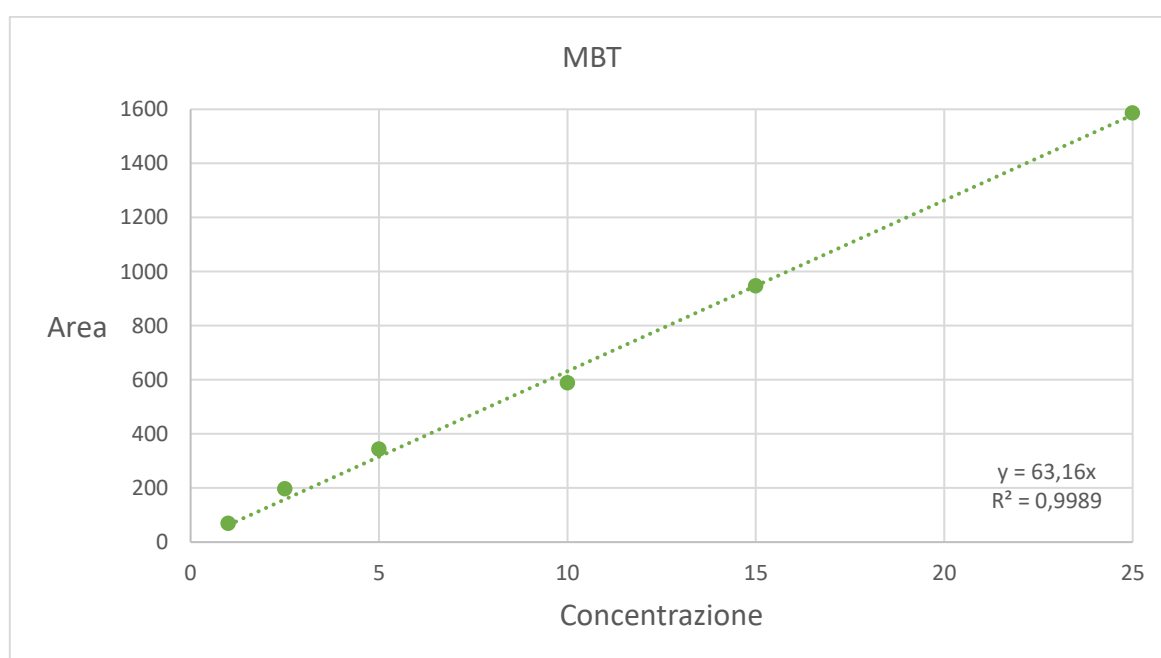


Fig. 6.10, Curva di calibrazione MBT

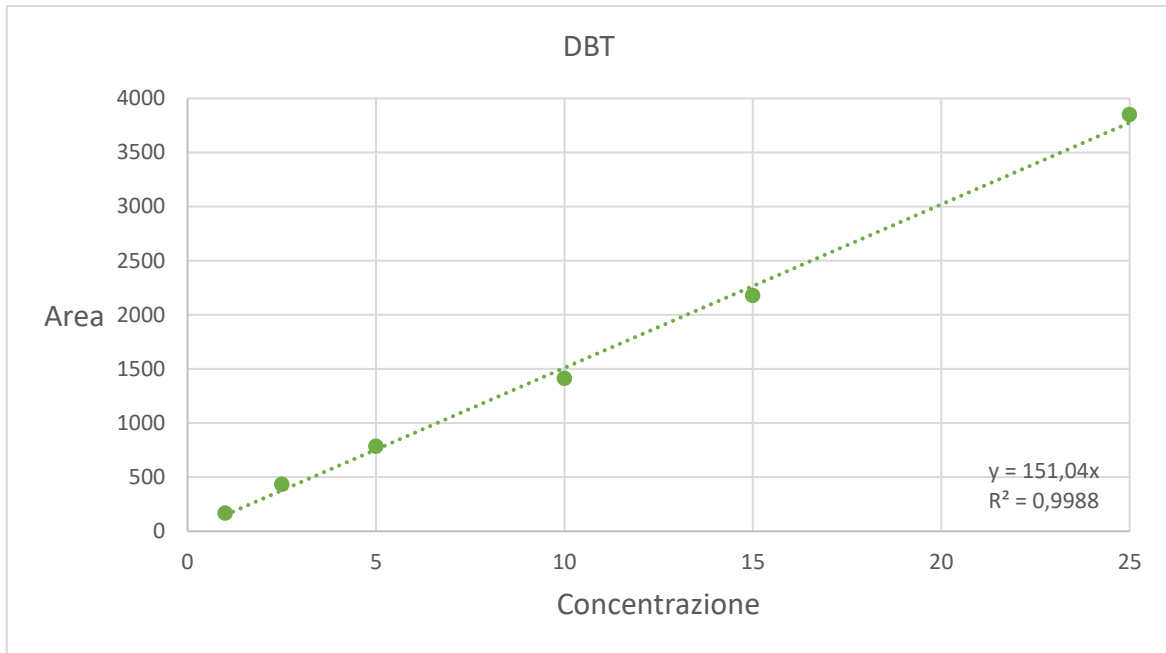


Fig. 6.11, Curva di calibrazione DBT

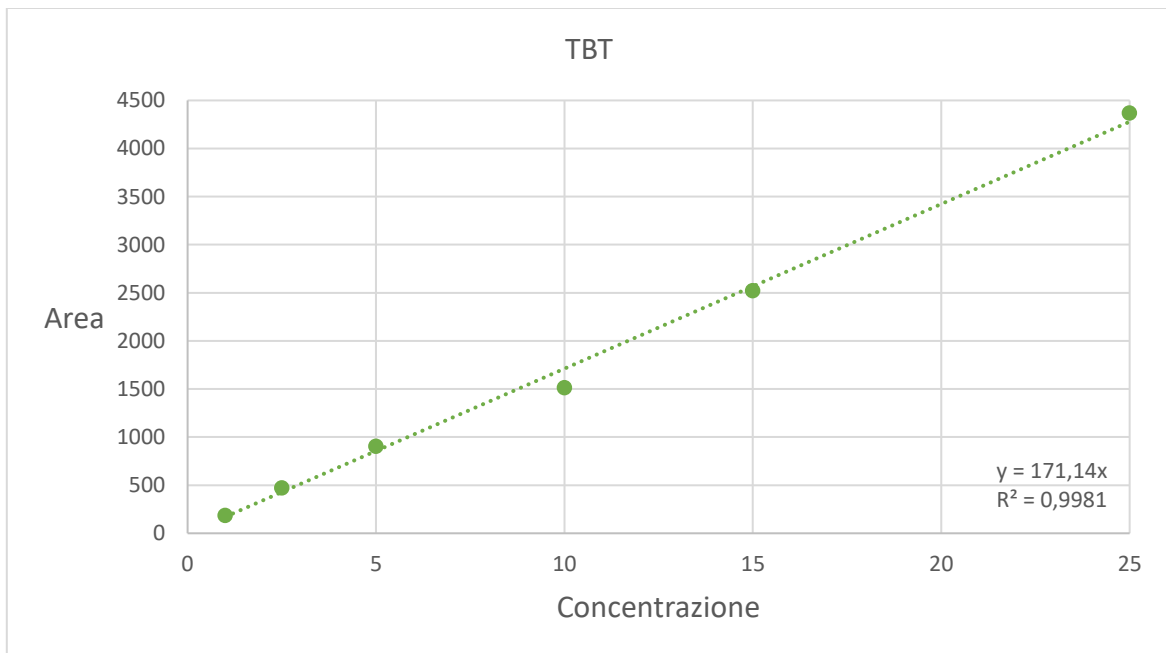


Fig. 6.12, Curva di calibrazione TBT

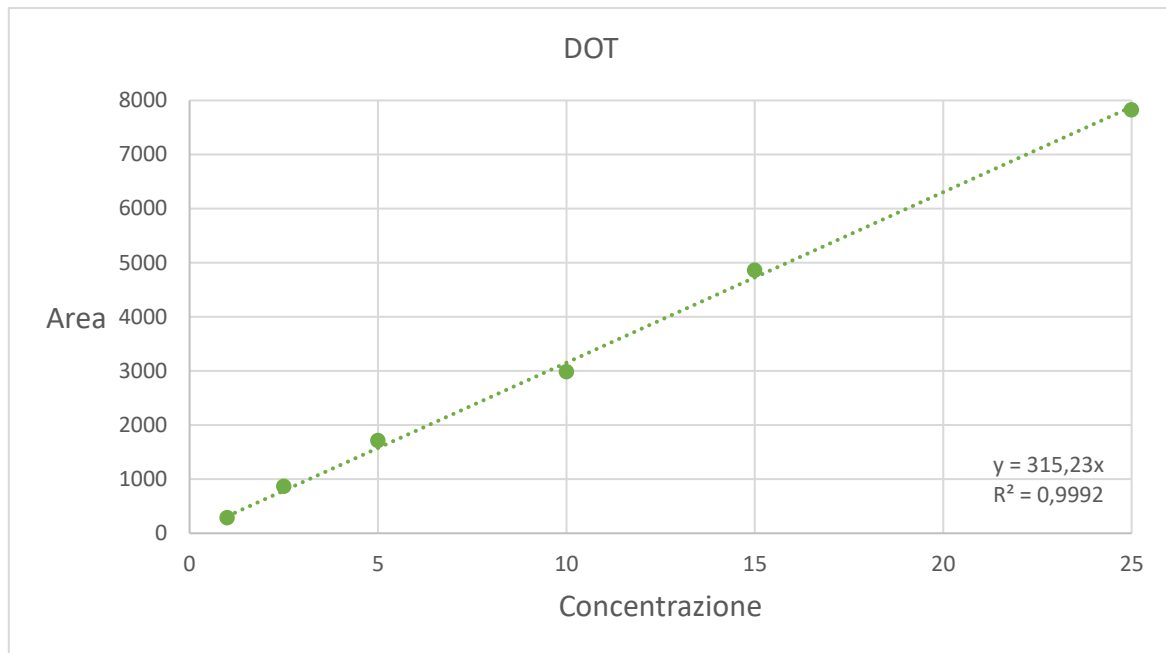


Fig. 6.13, Curva di calibrazione DOT

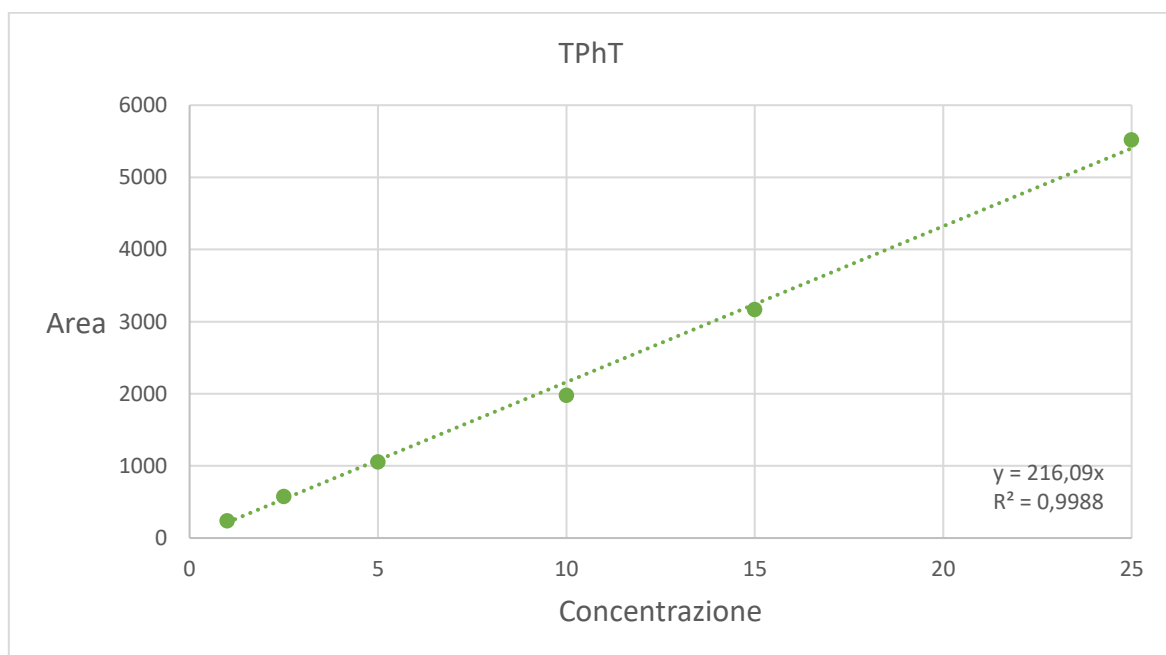


Fig. 6.14, Curva di calibrazione TPhT

Per ogni grafico relativo alle curve di calibrazione è stato riportato il coefficiente di determinazione  $R^2$ , ovvero il rapporto tra varianze. In condizioni ideali questo valore corrisponderebbe ad 1, mentre per una calibrazione reale lineare si associa a  $R^2 \geq 0,99$  come parametro per stabilire se il metodo soddisfa i criteri minimi o meno. Come si può notare, ogni curva ha un valore maggiore pertanto la calibrazione risulta accettabile.

### 6.2.2 Errori e incertezze

In questa sezione viene riportata la trattazione statistica relativa alla valutazione dei contributi di incertezza che si incontrano durante la validazione del metodo. Questi contributi sono dovuti al fatto che l'incertezza può derivare da differenti fonti, come per esempio: diluizioni, calibrizioni, ripetibilità, taratura e pesata. Ciascuna di questa viene considerata per calcolare l'incertezza globale. I contributi vengono espressi mediante scarti tipo<sup>(55)</sup>.

Mediante la teoria della propagazione degli errori, si è calcolato l'errore relativo alle concentrazioni degli standard considerando i volumi coinvolti durante i prelievi.

Per le singole concentrazioni si considera il grado di purezza (%) del materiale di riferimento impiegato (**Tabella 6.9**), identificato mediante certificato di analisi. L'incertezza che ne consegue, è stata calcolata utilizzando la relazione:

$$\text{Incertezza tipo (\%)} = \frac{100 - P\%}{2\sqrt{3}}$$

Composto	Purezza [%]	Incertezza tipo [%]	Produttore
Monobutyltin	96	3,464	Sigma Aldrich
Dibutyltin	96	3,464	Sigma Aldrich
Tributyltin	96	3,464	Sigma Aldrich
Dioctyltin	96	3,464	Sigma Aldrich
Triphenyltin	97	2,598	Sigma Aldrich

Tabella 6.9, Materiali di riferimento

Ai fini del calcolo, il valore di incertezza da tenere in considerazione è 3,464 %.

Gli ulteriori contributi di incertezza da considerare sono in relazione ai volumi delle diluizioni effettuate in procedura sperimentale. Dalla soluzione madre dei composti impiegati è stata preparata una diluizione per ottenere una soluzione a 1000 mg/L in solvente, pesando 10 mg in un matraccio tarato da (10 ± 0,025) mL. L'incertezza del matraccio è stata calcolata con la relazione:

$$\text{Incertezza matraccio} = \frac{(\Delta V_{\text{matraccio}})}{V_{\text{matraccio}} * \sqrt{3}} * 100 = \frac{0,025}{10 * \sqrt{3}} * 100 = 0,14 \%$$

mentre l'incertezza sul titolo della soluzione a 1000 mg/L è calcolata mediante i contributi relativi all'incertezza del matraccio e all'incertezza massima della purezza. Il tutto segue la relazione:

$$\begin{aligned} \text{Incertezza sol } 1000 \text{ mg/L} &= \sqrt{(\text{Inc matraccio})^2 + (\text{Inc massima})^2} = \sqrt{(0,14)^2 + (3,464)^2} \\ &= 3,47 \% \end{aligned}$$

Dalle soluzioni madre sono state preparate soluzioni a 1 mg/L per diluizione di 10 µL in solvente, prelevati con una micropipetta da  $(10 \pm 0,2)$  µL, in un matraccio tarato da  $(10 \pm 0,025)$  mL. L'incertezza, che ne deriva, sul primo è:

$$\text{Incertezza siringa} = \sqrt{\frac{\Delta V_{\text{micropipetta}}}{V_{\text{micropipetta}} * \sqrt{3}}} * 100 = \sqrt{\frac{0,2}{10 * \sqrt{3}}} * 100 = 2,58 \%$$

Mentre per l'incertezza del secondo volume si riprende l'equazione utilizzata per il matraccio.

Infine, l'incertezza sul titolo della soluzione a 1 mg/L è pertanto:

$$\begin{aligned} \text{Inc Titolo sol a } 1 \text{ mg/L} &= \sqrt{(\text{Inc Titolo sol } 1000 \text{ mg/L})^2 + (\text{Inc micropipetta})^2 + (\text{Inc matraccio})^2} \\ &= 4,33 \% \end{aligned}$$

Le soluzioni per la calibrazione sono state preparate in matracci da 1 mL, per addizione delle soluzioni diluite e dello standard interno diluito.

In **Tabella 6.10** sono riportate le incertezze per ogni livello di taratura. I relativi parametri sono stati ottenuti mediante

$$\text{Inc rel vol prel} = \frac{\text{Inc vol prel}}{\text{spike}} * 100$$

$$\text{Inc rel vol fin} = \frac{\text{Inc vol fin}}{50} * 100$$

$$\text{Inc tot} = \sqrt{(\text{Inc rel vol prel})^2 + (\text{Inc rel vol fin})^2}$$

Con:

- Inc vol prel: relativo al volume prelevato con la micropipetta

$$\text{Inc vol prel} = \frac{n. \text{ prelievi}}{\sqrt{3}}$$

- In vol fin: relativo al volume finale del matraccio da  $(5 \pm 0,025)$  mL

$$Inc\ vol\ fin = \frac{\Delta V_{matraccio}}{V_{matraccio} * \sqrt{3}} = \frac{0,025}{5 * \sqrt{3}} = 0,002886751$$

Spike [µL]	µg/L	Inc Vol Prel [µL]	Inc Vol fin [mL]	Inc Rel Vol Prel [%]	Inc Rel Vol Fin [%]	Inc Tot [%]	Tipo di micropipetta
20	1	0,577350269	0,002886751	2,89	0,00577	2,89	da 50µl
50	2,5	0,577350269	0,002886751	1,15	0,00577	1,15	da 50 µl
100	5	1,154700538	0,002886751	1,15	0,00577	1,15	da 100 µl
200	10	1,154700538	0,002886751	0,58	0,00577	0,58	da 100 µl
300	15	2,886751346	0,002886751	0,96	0,00577	0,96	da 250 µl
500	25	5,773502692	0,002886751	1,15	0,00577	1,15	da 250 µl

Tabella 6.10, Incertezze dei volumi prelevati e dei volumi finali

Dai dati riportati, si calcola l'incertezza media sulla costruzione della taratura facendo la media delle incertezze totali:

$$Inc\ media\ costruzione\ taratura = 1,32\ \%$$

Infine, mediante relazione:

$$\begin{aligned}
 Incertezza\ Titolo\ Standard &= \sqrt{(Inc\ media\ costruzione\ taratura)^2 + (Inc\ Titolo\ sol\ 1\ mg/L)^2} \\
 &= 4,52\ \%
 \end{aligned}$$

è stata trovata l'incertezza complessiva sul titolo delle soluzioni utilizzate in taratura.

### 6.2.3 Validazioni

La validazione del metodo, come descritto precedentemente nella **Sezione 5.2**, deve essere documentata in ogni step del processo, e deve garantire una serie di requisiti minimi che vengono definiti da parametri.

Per determinare il limite di detenzione LOD e poi LOQ sono stati preparati sette campioni di bianco, seguendo procedura *method blank*, e sono stati confrontati con sette ripetute di validazione.

In **Tabella 6.11** sono riportate le concentrazioni, già convertite con il fattore di diluizione, degli analiti presenti nei bianchi eseguiti con acqua Levissima.



Analiti	MB 1 [ng/L]	MB 2 [ng/L]	MB 3 [ng/L]	MB 4 [ng/L]	MB 5 [ng/L]	MB 6 [ng/L]	MB 7 [ng/L]
<b>Diocetyltn   Diheptyltn</b>	0,000423	0,000733	0,00286	0,000512	0,001409	0,002114	0,0012
<b>Monobutyltn   Monoheptyltn</b>	0,014666	0,012465	0,018256	0,014191	0,010598	0,011376	0,0068
<b>Dibutyltn   Diheptyltn</b>	0,001263	0,00111	0,00112	0,000353	0,000679	0,001091	0,0009
<b>Tributyltn   Tripropyltn</b>	0,000967	0,002202	0,002349	0,001115	0,001113	0,000898	0,0049
<b>Triphenyltn   Tripropyltn</b>	0,000275	0,000826	0,000321	0,0000	0,000509	0,000939	0,0116

Tabella 6.11, Concentrazioni analiti MB

Si calcola, di conseguenza, la media delle concentrazioni dei bianchi e la deviazione standard SD mediante relazione:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(C_i - \bar{C})^2}{N}}$$

In cui:

$C_i$  = Concentrazione singola del bianco

$\bar{C}$  = media delle concentrazioni del bianco

N = numero di ripetute

In **Tabella 6.12**, di conseguenza, si riportano i valori della media e della deviazione standard (SD).

Analiti	$\bar{C}$	SD
<b>Diocetyltn   Diheptyltn</b>	0,0013	0,0009
<b>Monobutyltn   Monoheptyltn</b>	0,0126	0,0036
<b>Dibutyltn   Diheptyltn</b>	0,0009	0,0003
<b>Tributyltn   Tripropyltn</b>	0,0019	0,0014
<b>Triphenyltn   Tripropyltn</b>	0,0021	0,0042

Tabella 6.12, Media e SD dei campioni bianchi

Mediante questi due parametri si calcola il valore di LOQ e MDL (**Tabella 6.13**), come descritto precedentemente nella **Sezione 5.2**.

Analiti	MDL	LOQ
<b>Diocetyltn   Diheptyltn</b>	0,00282	0,0090
<b>Monobutyltn   Monoheptyltn</b>	0,01128	0,0359
<b>Dibutyltn   Diheptyltn</b>	0,00099	0,0032
<b>Tributyltn   Tripropyltn</b>	0,00447	0,0142
<b>Triphenyltn   Tripropyltn</b>	0,01325	0,0422

*Tabella 6.13, Valori MDL e LOQ dei campioni bianchi*

L'accuratezza e la precisione sono fondamentali per il processo di validazione di un metodo, e si basano sulla ripetibilità e riproducibilità di misura. Durante il lavoro svolto in tirocinio, è stata valutata la ripetibilità, ovvero la misura della variabilità dei risultati riguardante l'operato di una singola persona impiegando la stessa strumentazione. Per ogni livello di concentrazione sono state eseguite 11 ripetute, e i livelli stessi sono stati scelti tra i punti di calibrazione (L1: cal 1, L2: cal 2, L3: cal 4, L4: cal 6). Per questo metodo sono state eseguite ripetute per le matrici di acqua potabile (DW), sotterranea (GW) e di scarico (WW). Nelle **Tabelle 6.14, 6.15 e 6.16** sono riportati i valori.

Ai fini dei calcoli sono state considerate tutte le cifre significative, le quali sono state ridotte in un secondo momento nelle tabelle per motivi di impaginazione.

DW	An.	V1 [ng/L]	V2 [ng/L]	V3 [ng/L]	V4 [ng/L]	V5 [ng/L]	V6 [ng/L]	V7 [ng/L]	V8 [ng/L]	V9 [ng/L]	V10 [ng/L]	V11 [ng/L]
<b>L1</b>	<b>DOT</b>	53,07	37,76	46,89	40,82	44,59	48,95	46,08	53,23	47,41	48,39	45,38
	<b>MBT</b>	40,86	42,22	41,14	40,90	34,44	40,27	39,41	37,48	39,91	39,64	41,42
	<b>DBT</b>	75,65	73,44	73,59	68,72	66,48	68,43	65,93	71,62	77,32	74,03	64,14
	<b>TBT</b>	40,69	39,40	37,95	38,97	37,18	38,84	41,46	36,43	39,37	43,08	37,44
	<b>TPhT</b>	49,27	47,48	48,45	42,19	42,72	45,42	48,47	42,89	47,64	45,28	45,17
<b>L2</b>	<b>DOT</b>	120,1	121,5	128,4	129,7	130,4	125,5	131,3	112,7	144,6	147,2	123,3
	<b>MBT</b>	91,16	90,10	86,88	96,38	100,3	95,54	102,2	93,37	108,1	106,8	100,8
	<b>DBT</b>	174,3	191,3	185,6	184,9	167,7	184,9	193,6	183,4	213,5	210,0	180,6
	<b>TBT</b>	95,68	96,53	94,85	86,87	101,2	94,95	95,94	98,02	92,67	97,74	97,03

	<b>TPhT</b>	107,8	117,9	104,8	110,1	120,3	109,9	99,96	113,7	110,4	122,2	116,1
<b>L3</b>	<b>DOT</b>	570,2	572,1	582,1	556,7	469,1	487,5	471,9	522,4	554,9	623,8	573,1
	<b>MBT</b>	458,4	430,5	439,7	418,9	418,6	425,6	369,7	410,2	411,6	473,7	433,0
	<b>DBT</b>	433,9	401,9	383,9	360,6	331,1	337,5	328,2	351,9	366,8	405,8	380,3
	<b>TBT</b>	391,3	415,0	385,7	392,9	392,9	383,1	385,3	397,2	383,1	423,9	397,0
	<b>TPhT</b>	457,7	451,7	445,5	467,3	468,8	416,2	472,8	465,6	460,8	556,8	475,7

Tabella 6.14, Ripetizione acqua superficiale

<b>GW</b>	<b>An.</b>	<b>V1 [ng/L]</b>	<b>V2 [ng/L]</b>	<b>V3 [ng/L]</b>	<b>V4 [ng/L]</b>	<b>V5 [ng/L]</b>	<b>V6 [ng/L]</b>	<b>V7 [ng/L]</b>	<b>V8 [ng/L]</b>	<b>V9 [ng/L]</b>	<b>V10 [ng/L]</b>	<b>V11 [ng/L]</b>
<b>L1</b>	<b>DOT</b>	53,36	54,25	48,07	55,06	56,02	53,87	59,53	57,31	50,55	58,01	26,24
	<b>MBT</b>	44,54	44,70	43,47	43,62	42,21	43,85	47,92	48,60	46,28	53,16	24,61
	<b>DBT</b>	36,60	43,31	40,39	39,55	38,91	36,66	43,00	41,83	43,46	44,27	35,19
	<b>TBT</b>	39,33	37,45	37,15	37,12	42,36	42,04	41,22	49,03	43,28	48,59	20,72
	<b>TPhT</b>	43,29	45,11	36,74	42,80	49,61	42,08	52,53	49,39	44,63	40,73	39,49
<b>L2</b>	<b>DOT</b>	109,0	119,8	89,28	123,1	112,6	110,7	110,3	121,7	125,4	123,7	120,6
	<b>MBT</b>	157,5	127,1	129,3	159,9	115,7	90,57	126,8	115,3	124,1	123,4	133,6
	<b>DBT</b>	118,2	137,1	137,9	144,4	135,9	123,7	135,2	133,3	144,9	158,7	152,3
	<b>TBT</b>	89,41	128,2	123,5	119,9	127,8	107,1	112,7	122,9	126,4	136,9	114,7
	<b>TPhT</b>	325,9	282,2	284,3	284,5	297,6	310,8	286,7	290,6	327,5	310,2	322,5
<b>L3</b>	<b>DOT</b>	418,8	599,2	504,6	517,3	500,2	522,7	439,5	494,8	470,8	526,5	525,0
	<b>MBT</b>	601,8	554,9	475,9	518,9	503,3	495,1	514,4	531,0	508,9	553,2	496,4
	<b>DBT</b>	481,6	692,3	678,3	680,8	613,1	666,5	629,5	559,5	595,8	611,3	611,4
	<b>TBT</b>	348,2	538,1	507,2	503,5	500,9	523,0	532,5	522,2	514,6	458,1	525,6
	<b>TPhT</b>	1111,0	1478,9	1276,9	1270,1	1394,6	1308,5	1340,1	1408,7	1360,1	1413,7	1366,6

Tabella 6.15, Ripetizione acqua sotterranea

<b>WW</b>	<b>An.</b>	<b>V1 [ng/L]</b>	<b>V2 [ng/L]</b>	<b>V3 [ng/L]</b>	<b>V4 [ng/L]</b>	<b>V5 [ng/L]</b>	<b>V6 [ng/L]</b>	<b>V7 [ng/L]</b>	<b>V8 [ng/L]</b>	<b>V9 [ng/L]</b>	<b>V10 [ng/L]</b>	<b>V11 [ng/L]</b>
<b>L4</b>	<b>DOT</b>	1473,3	1452,6	1364,2	1380,9	1354,9	1421,1	1293,0	1462,0	1398,9	1372,0	1285,6
	<b>MBT</b>	1799,2	1540,5	1218,6	1440,3	1506,4	1532,0	1470,8	1098,9	1293,3	1201,4	1627,4

<b>DBT</b>	1600,2	1598,9	1528,9	1557,9	1457,0	1547,3	1401,0	1606,6	1568,5	1525,8	1456,0
<b>TBT</b>	1322,9	1388,7	1375,3	1392,3	1327,5	1326,5	1298,6	1399,0	1401,7	1443,9	1395,1
<b>TPhT</b>	3341,1	3573,7	3546,6	3573,0	3542,6	3340,2	3445,4	3539,9	3350,0	3606,3	3511,4

Tabella 6.16, Ripetizione acqua di scarico

Lo step successivo era di confrontare il CV% del metodo con quello ricavato in laboratorio, per il livello di concentrazione più vicino rispetto a quello riportato nella norma europea. Nella **Tabella 6.17** si riportano i valori SD e CV% del metodo e del lavoro sperimentale.

Analiti	DW L1				GW L2				WW L4			
	Metodo		Validazione		Metodo		Validazione		Metodo		Validazione	
	SD [ng/L]	CV%	SD [ng/L]	CV%	SD [ng/L]	CV%	SD [ng/L]	CV%	SD [ng/L]	CV%	SD [ng/L]	CV%
<b>DOT</b>	1,87	17,6	4,299	9,358	18,21	7,9	10,45	9,081	0,143	7,3	59,10	4,287
<b>MBT</b>	2,71	15,4	2,257	5,689	17,04	12	19,16	15,02	0,929	16,9	176,6	12,68
<b>DBT</b>	3,75	13,3	4,279	6,079	11,92	5,9	11,63	8,405	0,112	6,5	66,99	4,393
<b>TBT</b>	1,41	13,9	2,012	5,158	38,99	9,8	12,86	10,78	0,135	10,6	43,92	3,195
<b>TPhT</b>	2,56	15,2	2,396	5,257	67,48	21,1	17,86	5,913	0,954	9,5	93,52	2,670

Tabella 6.17, Valori di SD e CV% di confronto per le differenti matrici

Come ulteriore prova di accettabilità dei valori, è stato calcolato il rapporto tra i CV%:

$$x = \frac{CV\%_{lab}}{CV\%_{met}}$$

Ed è stata eseguita la verifica della compatibilità del valore con quello previsto dalla norma di riferimento, nell'intervallo relativo a 11 ripetute come previsto dal manuale UNICHIM 179/1<sup>(70)</sup>:

$$0,57 < x < 1.431$$

I limiti di fiducia minimi e massimi del rapporto sono in funzione dei gradi di libertà:

$$v = n - 1$$

dove n è il numero di prove eseguite.

Se la procedura in esame ha un rapporto di CV% superiore a 1,431 il metodo non è applicabile e la validazione deve essere rieseguita per cercare di trovare una soluzione più performante. Nel caso in cui sia compreso nell'intervallo la procedura rispecchia il metodo di riferimento e può essere applicata; se, addirittura, è inferiore a 0,57, e la concentrazione è conforme, risulta migliore a livello di prestazione. Di seguito si riportano in **Tabella 6.18** i valori relativi al rapporto tra CV%.

Analiti	DW L1	GW L2	WW L4
<b>DOT</b>	0,532	1,150	0,587
<b>MBT</b>	0,369	1,252	0,750
<b>DBT</b>	0,457	1,425	0,676
<b>TBT</b>	0,371	1,102	0,301
<b>TPhT</b>	0,346	0,280	0,281

*Tabella 6.18, Rapporto tra CV% metodo-laboratorio*

I valori di CV% vengono impiegati per determinare l'incertezza composta relativa alle misure associate al livello di concentrazione preso in esame. Vengono utilizzati nel calcolo anche l'errore percentuale del titolo standard, visto nella **Sezione 6.2.2**, e l'errore sulle pesate, valutato internamente al laboratorio. Si ritiene valida la retta di taratura tenendo in riferimento il 20 % di tolleranza massima sul campione di riferimento CCV. Il contributo di questa incertezza viene calcolato mediante relazione:

$$\text{Incertezza taratura (\%)} = \frac{20}{\sqrt{3}} = 11,55 \%$$

Di conseguenza, l'incertezza composta è stata calcolata tramite la relazione:

$$\begin{aligned} & \text{Incertezza composta (\%)} \\ = & \sqrt{(CV\%)^2 + (\text{Incertezza taratura \%})^2 + (\text{Incertezza titolo})^2 + (\text{Incertezza pesata})^2} \end{aligned}$$

L'incertezza che si associa alla misura è quella estesa, ottenuta moltiplicando l'incertezza composta con un fattore di copertura K. Questo fattore varia a seconda dei gradi di libertà presi in esame: eseguendo 11 ripetute si ha un fattore di 2, corrispondente alla probabilità del 95,4 % che i risultati ricadano nell'intervallo.

$$\text{Incertezza estesa (\%)} = K * \text{Incertezza composta (\%)}$$

Nelle **Tabelle 6.19, 6.20 e 6.21** si riportano i valori delle incertezze, appena descritte, relative alla procedura di validazione per le differenti matrici.

Analiti	CV%	Incertezza di Taratura (%)	Incertezza Pesata (%)	Incertezza Titolo Standard (%)	Incertezza Composta (%)	Incertezza Estesa (%)
DOT	9,3584	11,55	2,00	4,52	15,66	31,3
MBT	5,6886	11,55	2,00	4,52	13,79	27,6
DBT	6,0789	11,55	2,00	4,52	13,95	27,9
TBT	5,1575	11,55	2,00	4,52	13,58	27,2
TPhT	5,2572	11,55	2,00	4,52	13,62	27,2

Tabella 6.19, Incertezze DW L1

Analiti	CV%	Incertezza di Taratura (%)	Incertezza Pesata (%)	Incertezza Titolo Standard (%)	Incertezza Composta (%)	Incertezza Estesa (%)
DOT	9,081	11,55	2,00	4,52	15,50	31,0
MBT	15,023	11,55	2,00	4,52	19,58	39,2
DBT	8,405	11,55	2,00	4,52	15,11	30,2
TBT	10,797	11,55	2,00	4,52	16,56	33,1
TPhT	5,913	11,55	2,00	4,52	13,88	27,8

Tabella 6.20, Incertezze GW L2

Analiti	CV%	Incertezza di Taratura (%)	Incertezza Pesata (%)	Incertezza Titolo Standard (%)	Incertezza Composta (%)	Incertezza Estesa (%)
DOT	4,2873	11,55	2,00	4,52	13,27	26,5
MBT	12,679	11,55	2,00	4,52	17,85	35,7
DBT	4,3931	11,55	2,00	4,52	13,31	26,6
TBT	3,1945	11,55	2,00	4,52	12,96	25,9
TPhT	2,6698	11,55	2,00	4,52	12,84	25,7

Tabella 6.21, Incertezze WW L4

Come si può notare, l'incertezza estesa relativa alle tre differenti matrici si trovano intorno ad un valore del 30 %.

Vista la natura costante dell'incertezza il Laboratorio applicherà, cautelativamente, il valore maggiore delle tre incertezze, esprimendo il risultato mediante la forma  $XXX \pm YYY \mu\text{g/L}$ .

Terminata la procedura di validazione si compila il Workflow preparativo ufficiale del metodo, illustrato in **Appendice 9.1**.

## 7 PCB – Parte sperimentale

### 7.1 Metodo sviluppato

La procedura, da cui è partito lo studio sperimentale, fa riferimento al metodo EPA 3510C<sup>(71)</sup>, il quale descrive la separazione degli analiti mediante un'estrazione liquido-liquido.

#### 7.1.1 Sostanze utilizzate

*Eptano (Sigma-Aldrich)*<sup>(58)</sup>: C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>, liquido incolore, impiegato come solvente di estrazione per i composti organostannici.

*Solfato di Sodio (Sigma-Aldrich)*<sup>(60)</sup>: Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, solido bianco inodore, impiegato come anidrificante. Precedentemente anidrificato in stufa a 130 °C per 2 ore.

*Dodecano (Sigma-Aldrich)*<sup>(72)</sup>: C<sub>12</sub>, liquido incolore, impiegato come solvente *keeper* per l'Aroclor 1016, in quanto con volumi troppo piccoli (inferiori a 700 µL nei metodi EPA) si volatilizza e di conseguenza si hanno perdite di campione.

*Cloruro di Sodio (Sigma-Aldrich)*<sup>(73)</sup>: NaCl, solido incolore inodore, impiegato per variare la forza ionica delle soluzioni, rendendo i composti organici meno solubili in modo tale da ottenere una separazione di fase più semplice.

*Soluzione multicomponente, ICAL PCx (0,5 mg/L)*: preparato commerciale impiegato per la calibrazione, ottenuto addizionando:

- 1 µL di 2,4,5,6- Tetracloro-m-xilene (UltraScientific, 2000 mg/L)
- 50 µL Aroclor 5460 (Neochema, 100 mg/L)
- 5 µL Aroclor 1260 (UltraScientific, 1000 mg/L)
- 5 µL Aroclor 1016 (UltraScientific, 1000 mg/L)

a 5 mL di acetone in un matraccio da 10 mL e portando successivamente a volume.

*Soluzione multicomponente, MIX PCx LCS (0,5 mg/L)*: preparato commerciale impiegato come controllo standard di laboratorio, ottenuto addizionando:

- 50 µL di Aroclor 5460 (Neochema, 100 mg/L)
- 5 µL Aroclor 1260 (UltraScientific, 1000 mg/L)

- 5 µL Aroclor 1016 (UltraScientific, 1000 mg/L)

a 5 mL di acetone in un matraccio da 10 mL e portando successivamente a volume.

*Soluzioni diluite e concentrate di MIX PCx LCS:* sono state preparate delle soluzioni diluendo quelle concentrate per ottenere concentrazioni di 0,05 mg/L, e delle soluzioni più concentrate per ottenere 5 mg/L.

*Soluzione multicomponente, ISTD Interno (0,1 mg/L):* preparato commerciale impiegato come standard interno, ottenuto aggiungendo 25 µL di 2,4,5,6-Tetracloro-m-xilene 2000 mg/L in 5 mL di acetone in un matraccio da 10 mL e portando successivamente a volume. Da questa soluzione sono poi stati prelevati, con micropipetta, 200 µL e addizionati a 5 mL di acetone in un secondo matraccio da 10 mL, portando, infine, a volume.

*Modificatore di matrice<sup>(66)</sup>:* preparato commerciale, si presenta in sospensione acquosa a base di cloruro di calcio diidrato, impiegato per modificare la viscosità della matrice e simulare, conseguentemente, una matrice di scarico.

### 7.1.2 Apparecchiature utilizzate

*Vetreteria da laboratorio:* pipette pasteur, becker (50 mL), matracci tarati (10 mL), provette (10 mL), vial da autocampionatore.

*Dosatori per solventi:* dosatori automatici con volume regolabile, inseriti nelle bottiglie dei solventi.

*Microsiringhe (Agilent):* impiegate per prelevare volumi di liquidi nell'intervallo 1-10 µL.

*Micropipette (Agilent):* impiegate per prelevare volumi di liquidi nell'intervallo 10-5000 µL.

*Bilancia analitica:* impiegata per pesare i campioni di validazione all'inizio della procedura sperimentale.

*Bagno ad ultrasuoni:* impiegato per favorire il contatto intimo tra le fasi.

*Agitatore Magnetico (IKA R015):* sistema a 15 postazioni, con tempo e velocità regolabili fino a 1200 rpm.

*Concentratore ad ago:* sistema TurboVap (Horizon XcelVap) costituito da un bagno riscaldato con piastra con 54 postazioni per le provette. In ognuna di queste postazioni è presente un ago che insuffla azoto. La temperatura del bagno, la durata del processo e le pressioni di azoto iniziali e finali sono regolabili.



*GC-ECD*: Gascromatografo associato a rivelatore a cattura di elettroni ECD. Si basa sulla rilevazione di segnali elettrici dopo il passaggio di un gas ionizzato tra gli elettrodi. Il sistema è costituito da un catodo e da un anodo, in cui il gas di trasporto uscente dalla colonna cromatografica attraversa la camera e viene ionizzato dalla sorgente di radiazioni  $\beta$ , generando una corrente di fondo di ioni che migra tra gli elettrodi e che rappresenta il valore della linea di fondo<sup>(74)</sup>. Questo tipo di rivelatore è particolarmente sensibile ai composti elettronegativi, quali composti contenenti alogeni, carbonili coniugati, nitriti e composti organometallici. Pertanto, viene impiegato per la determinazione di tracce di pesticidi, erbicidi e alogeno-derivati organici (PCB)<sup>(75)</sup>.

### 7.1.3 Procedura sperimentale

Per questo tipo di composti è stato eseguito uno studio sperimentale per ottenere una validazione di un processo ottimizzato rispetto al metodo in uso. Attualmente il Laboratorio utilizza l'estrazione SPE (descritto nella **Sezione 4.2**) per l'analisi dei PCB, richiedendo un impegno costante in termini di costo (per ogni campione viene impiegata una cartuccia SPE equivalente a circa 3 euro) nonché a livello di tempo, vista la continua necessità di attesa tra uno step e l'altro della procedura. Volti a migliorare questi aspetti, dunque, si è ricercato un metodo rapido ed efficace di estrazione liquido-liquido, e che allo stesso tempo doni maggiore efficienza di analisi e che sia più standardizzabile possibile.

Per procedere con le prove di calibrazione e validazione del metodo, sono state utilizzate aliquote di 500 mL di acqua prelevata da fonti differenti a seconda della matrice da validare. Per quanto riguarda l'acqua sotterranea è stata prelevata l'acqua proveniente dal rubinetto del laboratorio, mentre, come acqua di scarico si è usata acqua di rubinetto con addizione di modificatore di matrice, onde simulare la viscosità di un'acqua reflua. Le aliquote sono state prelevate e trasferite in bottiglie di vetro da 500 mL.

Ai fini dello studio si sono identificati cinque livelli di concentrazione, riportati in **Tabella 7.1**, e denominati L1, L2, L3, L4 e L5.

Livello	Spike MIX PCx LCS ACQUE [ $\mu$ L]	Concentrazione MIX PCx LCS ACQUE [mg/L]	Concentrazione attesa [ $\mu$ g/L]
L1	10	0,05	0,001
L2	50	0,05	0,005
L3	25	0,5	0,025
L4	100	0,5	0,1
L5	200	5	2

*Tabella 7.1, Livelli di concentrazione studiati per ripetute PCB*

Per ogni livello di concentrazione è stata eseguita la preparazione sperimentale di 11 campioni.

In una bottiglia di vetro di 500 mL sono stati inseriti altrettanti mL di acqua di rubinetto, in riferimento ai campioni GW, ed eventualmente sono stati inseriti 10 µL di modificatore di matrice per i campioni WW. Mediante l'uso di una micropipetta sono stati aggiunti 25 µL di surrogato PCB 209 a 200 mg/L e 20 µL di dodecano con, infine, addizione di 10 mL di eptano. Successivamente la bottiglia è stata chiusa con un tappo, agitata manualmente in modo vigoroso per almeno 10 secondi, ed è stata posta in un bagno a ultrasuoni per 5 minuti. Una volta completata la sonicazione, si è proceduti ad aggiungere tre spatole di sale (NaCl) e un'ancoretta magnetica in modo tale da sottoporre il sistema ad agitazione con un agitatore magnetico per 30 minuti a 700 o più rpm.

La soluzione è stata lasciata ad equilibrarsi per circa 5 minuti e successivamente, mediante l'uso di una pipetta pasteur, è stato prelevato l'eptano in superficie ed eluito su una cartuccia contenente circa 2 g di Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/silice. L'estratto è stato trasferito in una provetta da 10 mL ed è stato messo a concentrare fino a 0,5 mL con Turbovap sotto leggero flusso di azoto e ad una temperatura massima di 40 °C.

Infine, sono stati addizionati 10 µL di standard interno a 0,1 mg/L, trasferendo il contenuto in una vial da autocampionatore da 1,5 mL per poter eseguire, di conseguenza, l'analisi strumentale.

Una volta completate le ripetute relative ai primi livelli di concentrazioni, sia per la matrice sotterranea che per quella di scarico, è stata effettuata una ricerca bibliografica riguardante il limite di concentrazione di Aroclor, trovando nel metodo EPA 8082A<sup>(76)</sup> un valore di 2 µg/L per Aroclor 1254 e tale che ci potessimo confrontare secondo UNICHIM 179/1<sup>(70)</sup>. Essendo un valore maggiore rispetto a quelli tenuti in considerazione, è stata preparata un'ulteriore serie di ripetute denominata L5 (vedi **Tabella 7.1**).

#### 7.1.4 Analisi strumentale

L'analisi è basata sulla separazione cromatografica seguita da rilevamento mediante detector a cattura elettronica (ECD).

Per lo studio dei PCB è stato impiegato un gascromatografo *Agilent Technologies 6890N Network GC System* provvisto di autocampionatore *Agilent Technologies 7653A Automatic Sampler* programmabile con un software.

L'iniezione avviene in modalità Pulsed Splitless, tramite una iniezione completa e rapida, con volume di prelievo pari a 3,0 µL (T = 250 °C). La modalità di iniezione prevede un aumento di pressione del gas carrier, in questo caso Elio, flussato a 1,4 mL/min.

La colonna utilizzata è *Agilent Technologies HP – 5MS UI*, colonna capillare di dimensioni 30 m x 250 µm x 0,25 µm.

In **Tabella 7.2** sono riassunti i parametri relativi al metodo cromatografico.

Parametri	Settaggio
Colonna	Zebtron ZB – XLB – HT Inferno

Dimensioni	30 m x 250 $\mu\text{m}$ x 0,25 $\mu\text{m}$
T iniziale colonna	85 $^{\circ}\text{C}$
Flusso colonna	1,4 mL/min
Iniezione	<i>Pulsed Splitless</i>
Pressione di iniezione	60 psi x 0,8 min
Volume iniettato	3,0 $\mu\text{L}$

Tabella 7.2, Parametri sistema iniezione e colonna

Il forno, nel quale è inserita la colonna, ha una rampa di temperatura (Tabella 7.3 – Figura 7.1):

	$^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Valore [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Holding Time [min]
<b>Iniziale</b>	-	85	0,5
<b>1</b>	10	180	0
<b>2</b>	20	310	10

Tabella 7.3, Rampa di temperatura forno gascromatografo

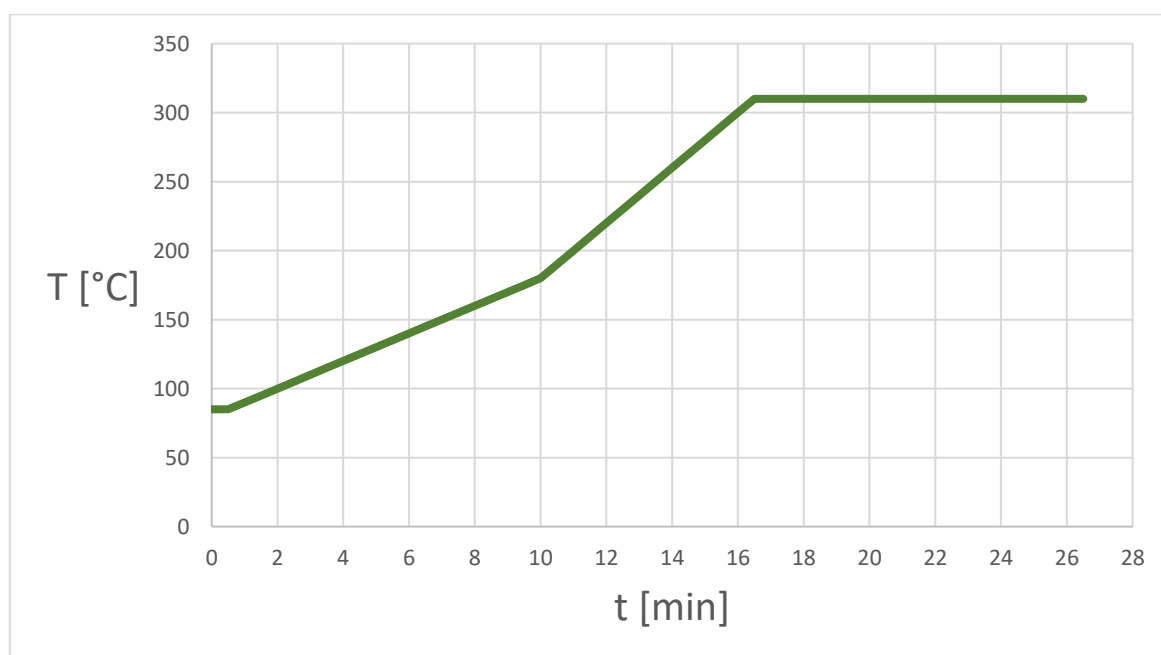


Fig. 7.1, Rampa di temperatura forno gascromatografo

Al termine della eluizione in colonna, i vari analiti giungono al detector ECD (T 325  $^{\circ}\text{C}$ ).

I campioni reali sono mandati a prova di *batch*, ovvero un quantitativo di campioni, corrispondente ad un massimo di 20, simili tra loro per matrice e processati impiegando lo stesso processo nello stesso momento. Per ogni *batch* viene preparato e caricato un controllo di calibrazione strumentale all'inizio e alla fine

dell'analisi, chiamato CCV (*Continuing Calibration Verification*). Questo controllo viene effettuato a metà della curva di calibrazione (vedi **Tabella 7.4**).

Per ogni *batch*, inoltre, si preparano dei controlli preparativi quali MB (*Method Blank*), LCS (*Laboratory Control Sample*) e LCSD (*Laboratory Control Sample Duplicate*). Il primo in questione è un campione preparato solo in matrice pulita (acqua Levissima) seguendo tutte le fasi previste dalla procedura operativa, in modo tale da visualizzare eventuali contaminazioni. LCS, invece consiste nella preparazione di campioni sempre in matrice pulita di acqua Levissima nella quale si introducono gli analiti a concentrazione nota. Per il metodo in esame viene addizionato la soluzione multicomponente MIX PCx LCS ACQUE (**Sezione 7.1.1**). Successivamente vengono eseguiti tutti gli step previsti dalla procedura sperimentale. Questo tipo di controllo serve a monitorare la performance del laboratorio. Infine, LCSD viene preparato per ottenere informazioni riguardanti la ripetibilità.

## 7.2 Risultati, discussione e confronto tra le differenti matrici

### 7.2.1 Calibrazioni

La calibrazione è stata affrontata con il metodo dello standard interno, basandosi su un confronto tra le risposte dello strumento relativo ai composti target e le risposte di altri standard addizionati in quantità standard al sistema prima dell'iniezione. Di conseguenza, la risposta del composto target viene normalizzata alla risposta dello standard interno utilizzato.

La retta di calibrazione per questo metodo è stata eseguita preparando 1 bottiglia scura di vetro da 500 mL etichettata e identificata come CALSEL (Calibration Standard Equipment). All'interno della bottiglia sono stati inseriti 500 mL di acqua Levissima ed è stato eseguito uno *spike* di 1000 µL di ICAL PCx preparato in acetone a 5 mg/L e un ulteriore *spike* di 100 µL di surrogato PCB 209 a 2 mg/L. Successivamente è stata condotta la procedura sperimentale riportata in **Sezione 7.1.3**, con unica eccezione nello step di riduzione del solvente a 1 mL e non 0,5 mL come per i campioni di validazione. La costruzione della calibrazione è avvenuta diluendo lo standard ottenuto in quantità differenti per ogni punto di calibrazione, addizionate ad 1 mL di eptano presente nelle vial precedentemente preparate ed etichettate con numero progressivo.

Di seguito si riporta in **Tabella 7.4** le differenti quantità *spikate* per ogni punto.

Punti di calibrazione	Concentrazione attesa analiti [µg/L]	Spike CALSEL [µL]
Cal 1	1	2
Cal 2	5	10
Cal 3	10	20
Cal 4	25	50
Cal 5	75	150
Cal 6	100	200

Tabella 7.4, Punti di calibrazione

Infine, sono stati addizionati 20 µL di ISTD a 0,1 mg/L.

I sei estratti recuperati sono stati iniettati nel GC-ECD e i cromatogrammi sono stati successivamente analizzati. Si riportano, di conseguenza, i cromatogrammi dei differenti livelli di concentrazione in **Figure 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6 e 7.7**.

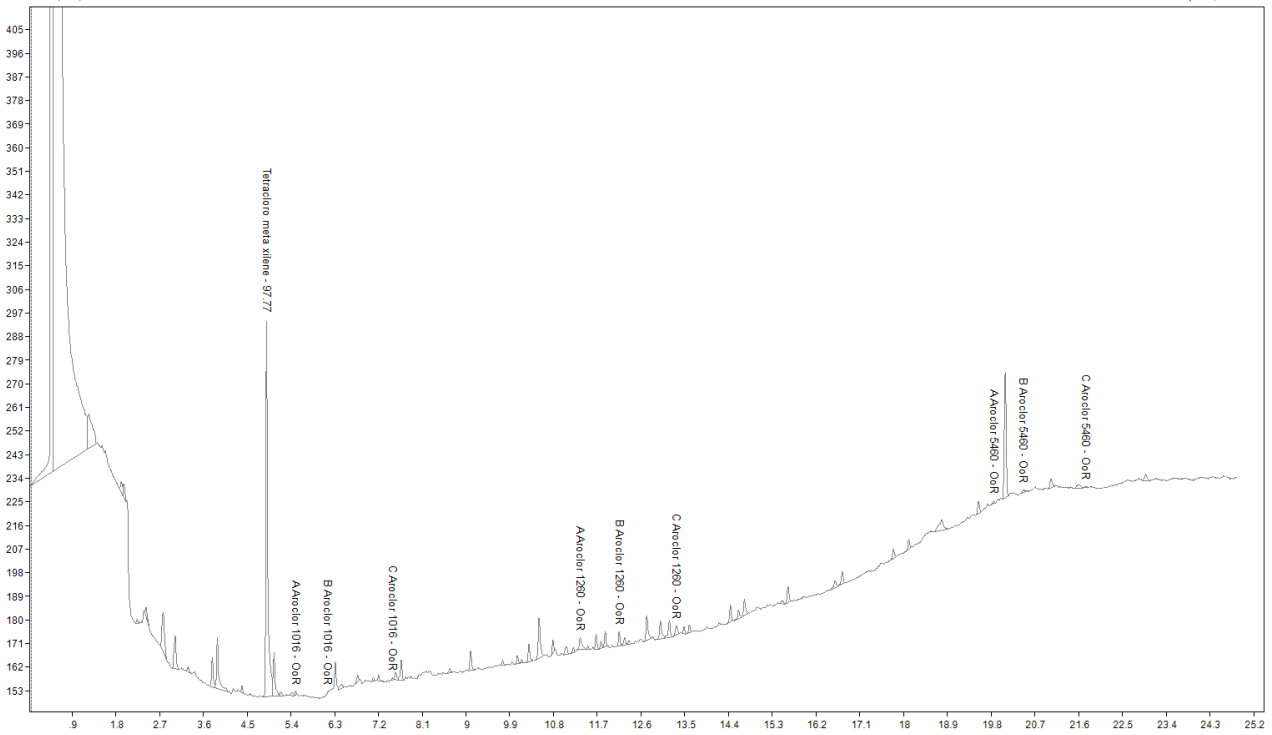


Fig. 7.2, Cromatoma punto di calibrazione 1

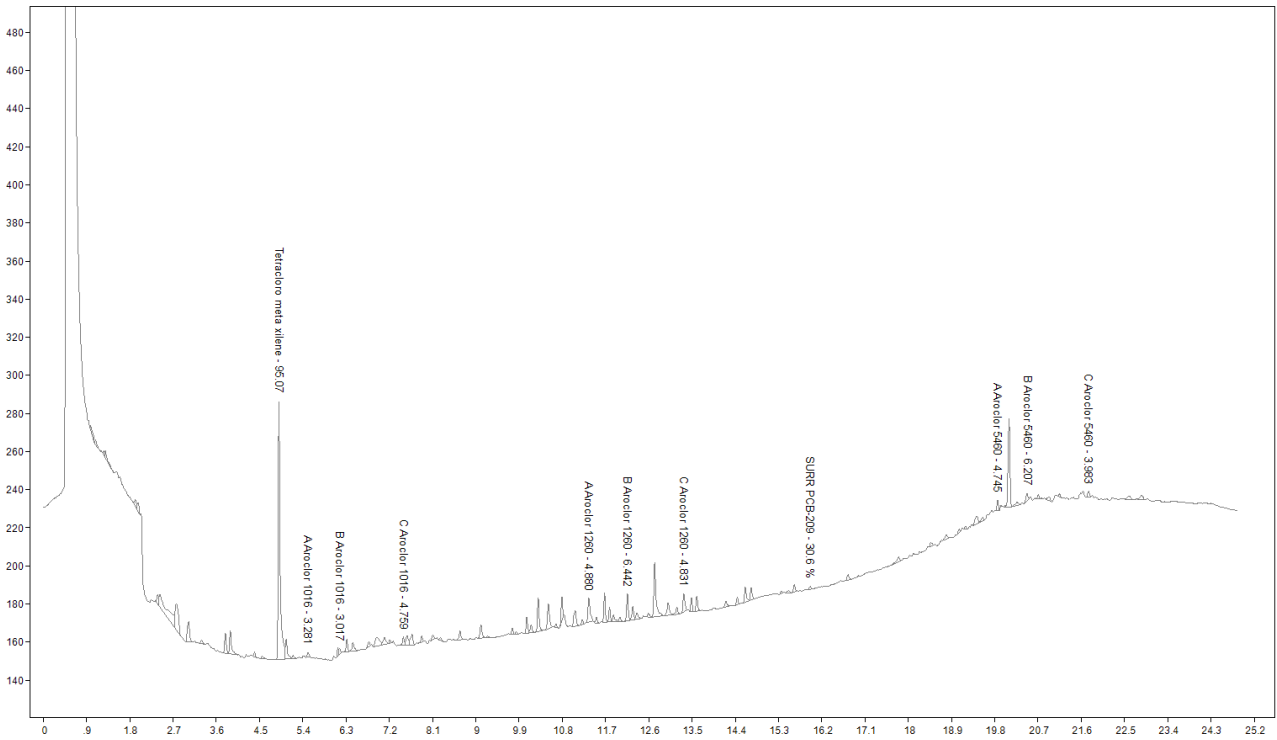


Fig. 7.3, Cromatogramma punto di calibrazione 2

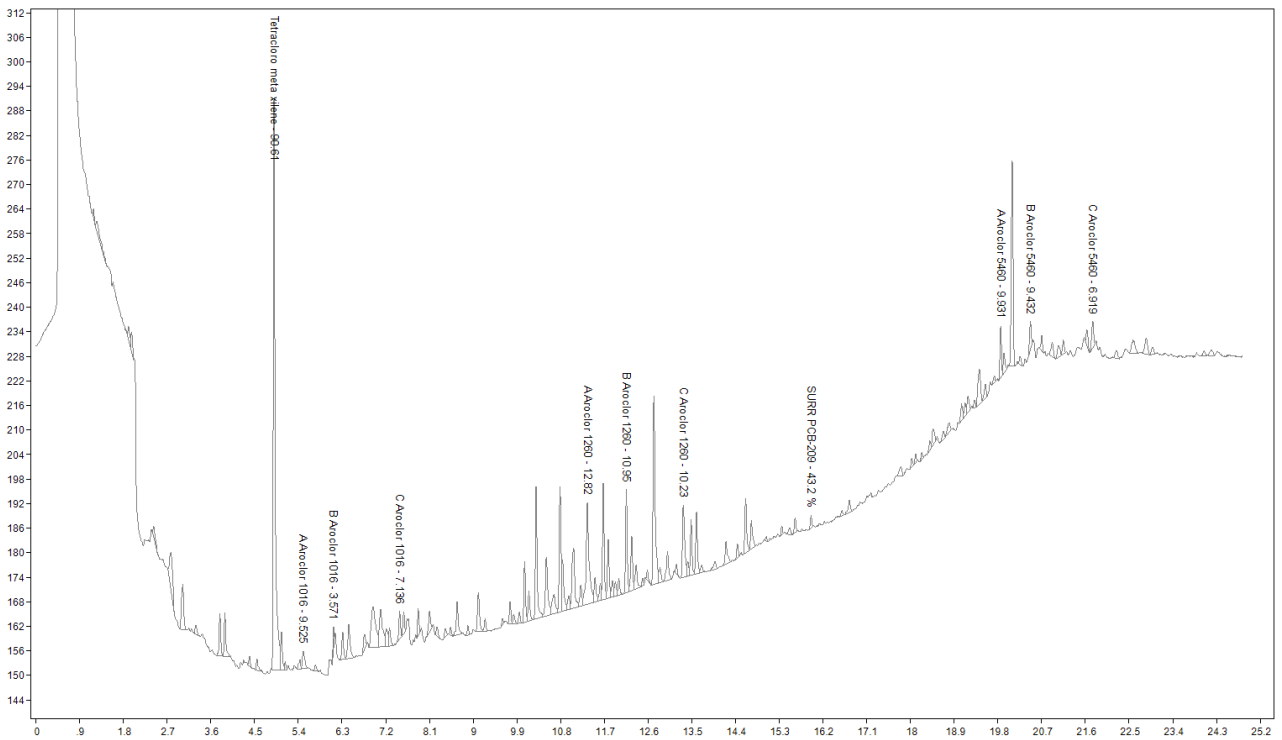


Fig. 7.4, Cromatogramma punto di calibrazione 3

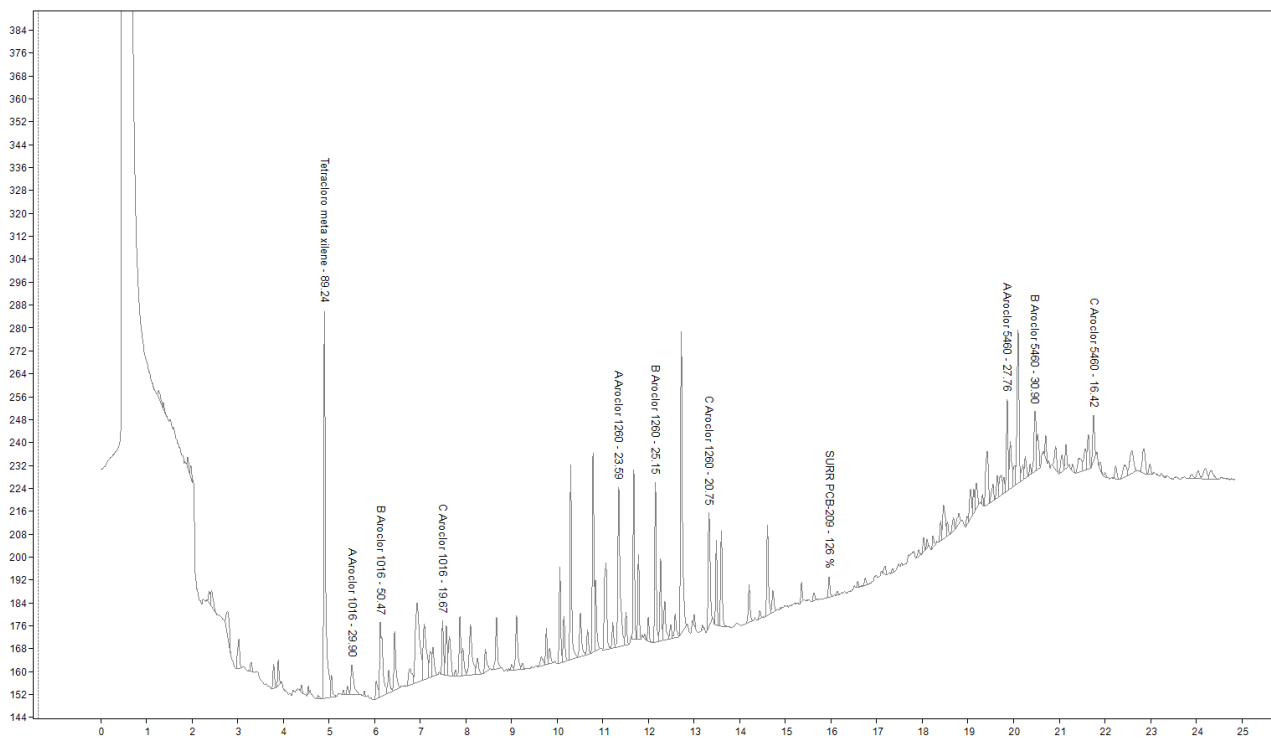


Fig. 7.5, Cromatogramma punto di calibrazione 4

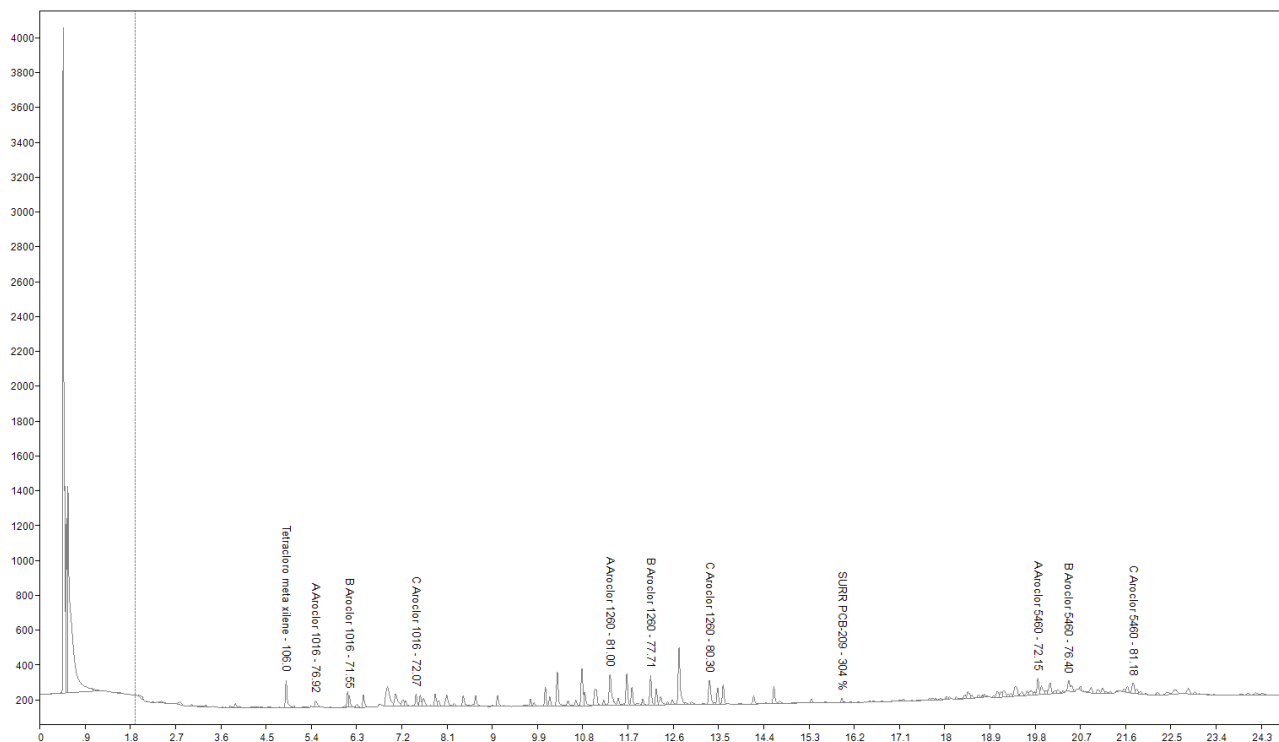


Fig. 7.6, Cromatogramma punto di calibrazione 5

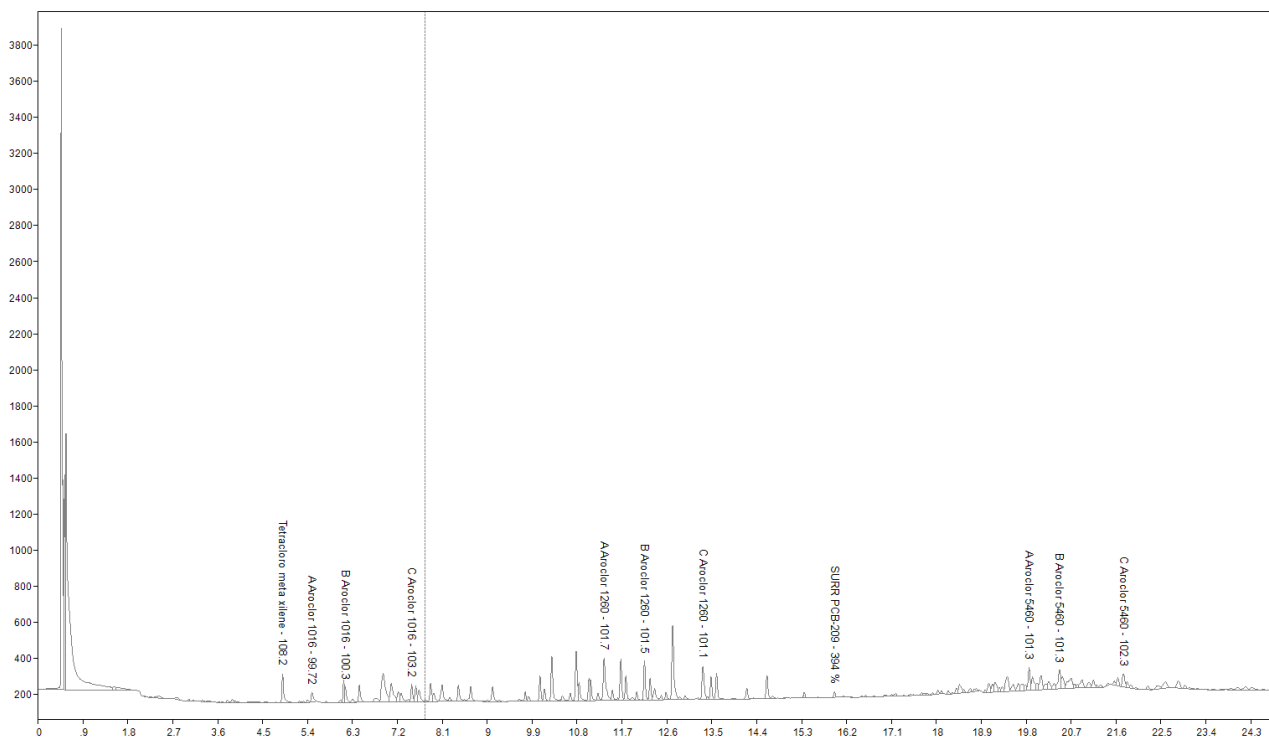


Fig. 7.7, Cromatogramma punto di calibrazione 6

La calibrazione è stata effettuata con tre punti caratteristici singoli dei differenti Aroclor esaminati. Si riportano in seguito i risultati delle integrazioni e le relative curve di calibrazioni di un punto per ciascun analita target (Tabelle 7.5, 7.6 e 7.7).



Punti di calibrazione	Concentrazione attesa analiti [ $\mu\text{g/L}$ ]	Area
Cal 1	1	2,549402
Cal 2	5	4,972484
Cal 3	10	14,65252
Cal 4	25	29,27983
Cal 5	75	118,1854
Cal 6	100	156,1858

Tabella 7.5, Risultati delle integrazioni della calibrazione per l'Aroclor 1016

Punti di calibrazione	Concentrazione attesa analiti [ $\mu\text{g/L}$ ]	Area
Cal 1	1	15,23956
Cal 2	5	40,1041
Cal 3	10	67,58242
Cal 4	25	193,9244
Cal 5	75	554,4327
Cal 6	100	815,7955

Tabella 7.6, Risultati delle integrazioni della calibrazione per l'Aroclor 1260

Punti di calibrazione	Concentrazione attesa analiti [ $\mu\text{g/L}$ ]	Area
Cal 1	1	1,54229
Cal 2	5	12,37503
Cal 3	10	26,33315
Cal 4	25	77,75052
Cal 5	75	231,7295
Cal 6	100	344,6529

Tabella 7.7, Risultati delle integrazioni della calibrazione per l'Aroclor 5460

Le relative curve di calibrazione si ottengono mettendo nell'asse delle ascisse la concentrazione e nell'asse delle ordinate l'area calcolata (**Figure 7.8, 7.9 e 7.10**). L'interpolazione lineare è stata forzata a zero, come descritto dal metodo EPA 8000D<sup>(69)</sup>, per limitare il *bias* a concentrazioni basse.

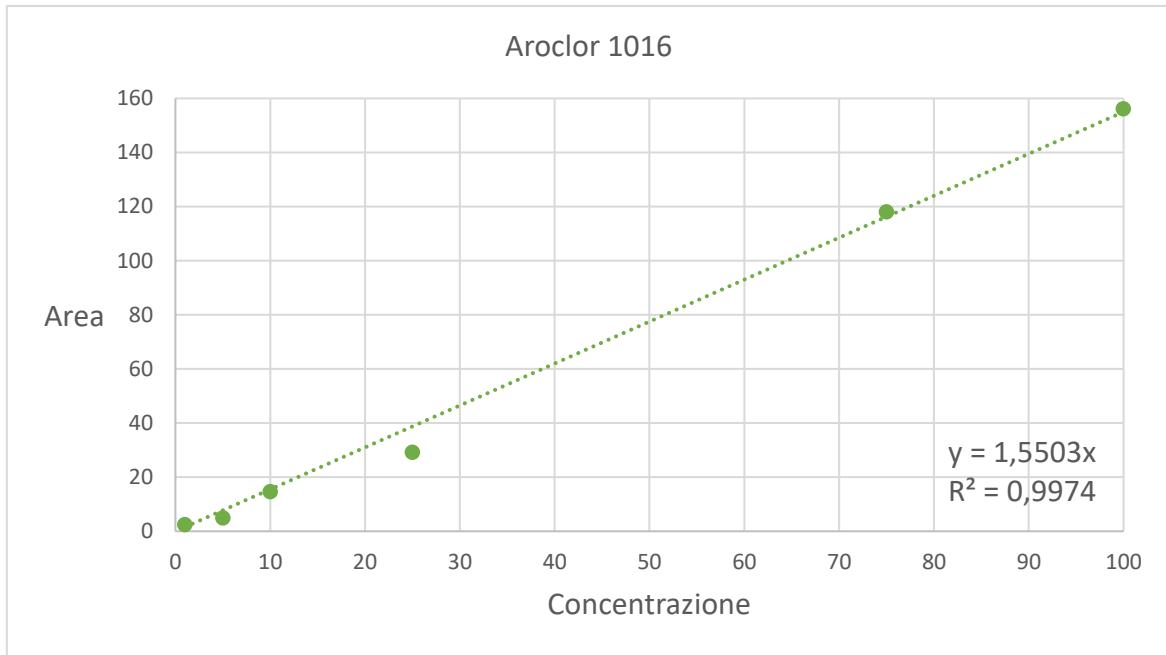


Fig. 7.8, Curva di calibrazione Aroclor 1016

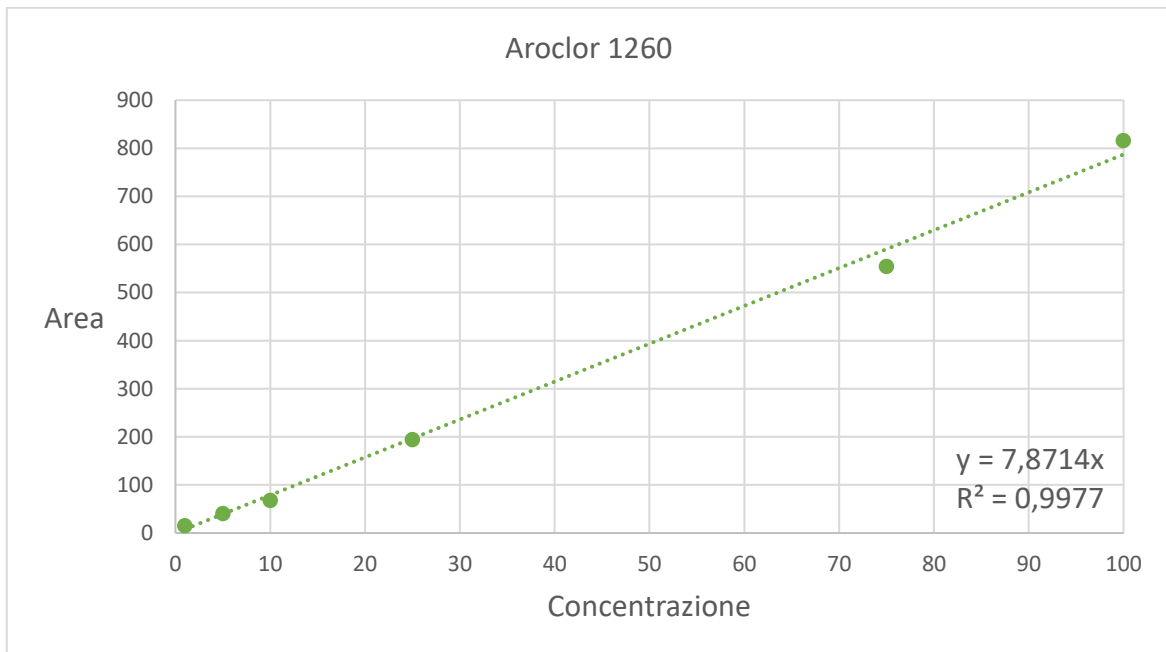


Fig. 7.9, Curva di calibrazione Aroclor 1260

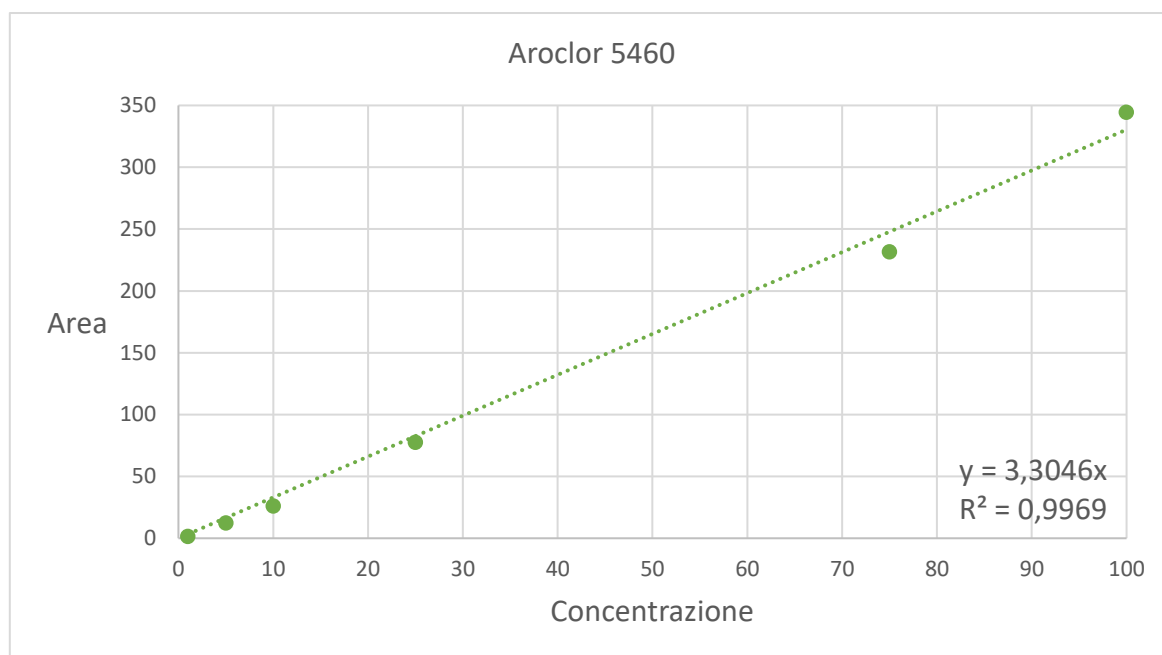


Fig. 7.10, Curva di calibrazione Aroclor 5460

Per ogni grafico relativo alle curve di calibrazione è stato riportato il coefficiente di determinazione  $R^2$ , ovvero il rapporto tra varianze. In condizioni ideali questo valore corrisponderebbe ad 1, mentre per una calibrazione reale lineare si associa a  $R^2 \geq 0,99$  come parametro per stabilire se il metodo soddisfa i criteri minimi o meno. Come si può notare, ogni curva ha un valore maggiore pertanto la calibrazione risulta accettabile.

### 7.2.2 Errori e incertezze

L'errore relativo alle concentrazioni degli standard è stato calcolato considerando i volumi coinvolti durante i prelievi.

In **Tabella 7.8** sono riportati i materiali di riferimento impiegati nella procedura sperimentale, con relativa concentrazione identificata mediante certificato di analisi.

Composto	Valore [µg/mL]	Produttore
Aroclor 1016	1000 ± 60	UltraScientific
Aroclor 1260	1004 ± 5	Sigma Aldrich
Aroclor 5460	100 ± 3,5	Neochema
Halowax 1099	100 ± 0,5	UltraScientific

Tabella 7.8, Materiali di riferimento

Per l'Aroclor 1260 si è considerata una distribuzione rettangolare, ottenendo una incertezza tipo mediante relazione:

$$\text{Incertezza tipo} = \frac{\Delta V}{V * \sqrt{3}} * 100 = \frac{60}{1000 * \sqrt{3}} * 100 = 3,46 \%$$

È stata preparata una soluzione a 1 mg/L diluendo 10 µL prelevati con micropipetta da (10 ± 0,2) µL, in un matraccio tarato da (10 ± 0,025) mL. L'incertezza sui volumi che se ne ricava è:

$$\text{Inc volumi} = \sqrt{(\text{Inc micropipetta})^2 + (\text{Inc matraccio})^2} = \sqrt{\left(\frac{0,02}{10 * \sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0,025}{10 * \sqrt{6}}\right)^2} = 1,32 \%$$

Come si può notare dall'equazione, per i due valori di incertezza è stata associata un tipo differente di distribuzione. Il calcolo dell'incertezza si basa su tre distribuzioni: rettangolare, triangolare e normale. A seconda di quale si utilizza, varia il fattore moltiplicativo, rispettivamente:  $\sqrt{3}$ ,  $\sqrt{6}$  e  $\sqrt{9}$ . Si fa riferimento alla distribuzione rettangolare quando è possibile assumere che tutti i valori di misura sono equiprobabili. Si basa sulla triangolare il valore misurato con probabilità di ricadere verso il valore medio piuttosto degli estremi dell'intervallo, seguendo una variazione lineare tra questi e il valor medio. Nel momento, invece, in cui non si ha questa linearità, ma si ha una distanza maggiore, la distribuzione di riferimento è quella normale o gaussiana<sup>(77)</sup>.

Come riportato ISTISAN 03/30 in merito alla Guida EURACHEM/CITAC CG 4<sup>(55)</sup> del 2000, alla vetreria si associa una distribuzione di tipo triangolare, mentre per parametri quali purezza, massa, temperatura e altra strumentazione si fa riferimento alla distribuzione rettangolare<sup>(55)</sup>.

Successivamente all'incertezza dei volumi, è stata calcolata l'incertezza sul titolo della soluzione a 1 mg/L, quale:

$$\text{Inc Titolo sol a 1 mg/L} = \sqrt{(\text{Inc vol})^2 + (\text{Inc tipo})^2} = \sqrt{(1,32)^2 + (3,46)^2} = 3,71 \%$$

In **Tabella 7.9** sono riportate le incertezze per ogni livello di taratura e i relativi parametri sono stati ottenuti mediante:

$$\text{Inc rel vol prel} = \frac{\text{Inc vol prel}}{\text{spike}} * 100$$

$$\text{Inc rel vol fin} = \frac{\text{Inc vol fin}}{50} * 100$$

$$Inc\ tot = \sqrt{(Inc\ rel\ vol\ prel)^2 + (Inc\ rel\ vol\ fin)^2}$$

Con:

- Inc vol prel: relativo al volume prelevato con la micropipetta

$$Inc\ vol\ prel = \frac{n.\ prelievi}{\sqrt{3}}$$

- In vol fin: relativo al volume finale del matraccio da  $(5 \pm 0,025)$  mL

$$Inc\ vol\ fin = \frac{\Delta V_{matraccio}}{\sqrt{3}} = \frac{0,025}{\sqrt{3}} = 0,014433757$$

Spike [μL]	μg/L	Inc Vol Prel [μL]	Inc Vol fin [mL]	Inc Rel Vol Prel [%]	Inc Rel Vol Fin [%]	Inc Tot [%]	Tipo di micropipetta
2	1	0,115470054	0,014433757	5,77	0,03	5,77	da 10 μl
10	5	0,115470054	0,014433757	1,15	0,03	1,16	da 10 μl
20	10	0,577350269	0,014433757	2,89	0,03	2,89	da 50 μl
50	25	0,577350269	0,014433757	1,15	0,03	1,16	da 50 μl
100	50	1,154700538	0,014433757	1,15	0,03	1,16	da 100 μl
150	75	2,886751346	0,014433757	1,92	0,03	1,92	da 250 μl

Tabella 7.9, Incertezze dei volumi prelevati e dei volumi finali

Dai dati riportati, si calcola l'incertezza media sulla costruzione della taratura facendo la media delle incertezze totali:

$$Inc\ media\ costruzione\ taratura = 2,21\ \%$$

Infine, mediante relazione:

$$\begin{aligned} Incertezza\ Titolo\ Standard &= \sqrt{(Inc\ media\ costruzione\ taratura)^2 + (Inc\ Titolo\ sol\ 1\ mg/L)^2} \\ &= 4,32\ \% \end{aligned}$$

è stata trovata l'incertezza complessiva sul titolo delle soluzioni utilizzate in taratura.

È stata presa in riferimento l'incertezza tipo e l'incertezza del titolo standard relativa all'Aroclor 1260, dopo il calcolo dei contributi per tutti i materiali di riferimento della **Tabella 7.8**. È stato scelto il valore di contributo maggiore.

### 7.2.3 Validazioni

Per la determinazione del valore di LOQ sono stati preparati sette campioni di bianco, seguendo procedura *method blank*, e successivamente confrontati con sette ripetute di validazione.

In **Tabella 7.10** sono riportate le concentrazioni degli analiti presenti nei bianchi eseguiti con acqua Levissima.

Analiti	MB 1 [µg/L]	MB 2 [µg/L]	MB 3 [µg/L]	MB 4 [µg/L]	MB 5 [µg/L]	MB 6 [µg/L]	MB 7 [µg/L]
<b>Aroclor 1016</b>	0,000094	0,000141	0,000011	0,000060	0,000024	0,000079	0,000091
<b>Aroclor 1260</b>	0,000311	0,000041	0,000021	0,000012	0,000023	0,000050	0,000317
<b>Aroclor 5460</b>	0,000025	0,000014	0,000028	0,000031	0,000036	0,000032	0,000025

*Tabella 7.10, Concentrazioni campioni bianchi*

Sono state calcolate la media di queste sette concentrazioni ( $\bar{C}$ ) e la deviazione standard SD (**Tabella 7.11**), mediante relazione vista precedentemente nella **Sezione 6.2.3**.

Analiti	$\bar{C}$	SD
<b>Aroclor 1016</b>	0,00007	0,00004
<b>Aroclor 1260</b>	0,00011	0,00014
<b>Aroclor 5460</b>	0,00003	0,00001

*Tabella 7.11, Media e SD dei campioni bianchi*

Di conseguenza, si calcola il valore di LOQ e MDL (**Tabella 7.12**), come descritto precedentemente nella **Sezione 5.2**.

Analiti	MDL	LOQ
<b>Aroclor 1016</b>	0,00014	0,00044
<b>Aroclor 1260</b>	0,00044	0,00139
<b>Aroclor 5460</b>	0,00002	0,00007

*Tabella 7.12, Valori MDL e LOQ dei campioni bianchi*

Per questo metodo sono state eseguite ripetute per le matrici di acqua sotterranea (GW) e di scarico (WW). Nelle **Tablelle 7.13 e 7.14** sono riportati i valori.

Ai fini dei calcoli sono state considerate tutte le cifre significative, le quali sono state ridotte in un secondo momento nelle tabelle per motivi di impaginazione.

GW	An.	V1 [µg/L]	V2 [µg/L]	V3 [µg/L]	V4 [µg/L]	V5 [µg/L]	V6 [µg/L]	V7 [µg/L]	V8 [µg/L]	V9 [µg/L]	V10 [µg/L]	V11 [µg/L]
L1	1016	0,0078	0,0100	0,0118	0,0106	0,0114	0,0098	0,0117	0,0146	0,0160	0,0162	0,0086
	1260	0,0013	0,0018	0,0019	0,0013	0,0013	0,0021	0,0019	0,0013	0,0016	0,0020	0,0023
	5460	0,0011	0,0016	0,0016	0,0011	0,0011	0,0011	0,0011	0,0011	0,0018	0,0012	0,0014
L2	1016	0,0246	0,0230	0,0179	0,01826	0,02274	0,0141	0,0186	0,0131	0,0184	0,0154	0,0202
	1260	0,0031	0,0042	0,0048	0,00457	0,00482	0,0044	0,0047	0,0034	0,0036	0,0044	0,0035
	5460	0,0029	0,0023	0,0035	0,00301	0,00292	0,0031	0,0036	0,0022	0,0028	0,0039	0,0031
L3	1016	0,027	0,027	0,024	0,027	0,028	0,032	0,030	0,030	0,024	0,031	0,021
	1260	0,028	0,036	0,029	0,028	0,037	0,034	0,039	0,034	0,031	0,036	0,033
	5460	0,025	0,041	0,030	0,036	0,037	0,035	0,040	0,037	0,032	0,039	0,030
L4	1016	0,091	0,081	0,076	0,083	0,080	0,082	0,085	0,091	0,101	0,087	0,085
	1260	0,082	0,082	0,080	0,077	0,083	0,091	0,087	0,094	0,117	0,075	0,089
	5460	0,109	0,103	0,085	0,099	0,106	0,126	0,107	0,098	0,133	0,073	0,111
L5	1016	3,292	2,070	2,453	2,421	2,103	2,346	2,329	2,242	1,767	2,716	2,661
	1260	2,127	1,753	1,711	1,884	1,730	1,691	2,025	1,675	1,350	2,105	2,192
	5460	2,059	1,844	2,256	2,090	2,373	2,000	1,966	1,800	1,623	2,072	2,165

Tabella 7.13, Ripetizione acqua sotterranea

WW	An.	V1 [µg/L]	V2 [µg/L]	V3 [µg/L]	V4 [µg/L]	V5 [µg/L]	V6 [µg/L]	V7 [µg/L]	V8 [µg/L]	V9 [µg/L]	V10 [µg/L]	V11 [µg/L]
L1	1016	0,0089	0,0275	0,0113	0,0190	0,0173	0,0193	0,0166	0,0121	0,0168	0,0220	0,0178
	1260	0,0028	0,0068	0,0136	0,0039	0,0021	0,0023	0,0110	0,0019	0,0115	0,0045	0,0099
	5460	0,0033	0,0038	0,0148	0,0036	0,0033	0,0044	0,0130	0,0034	0,0098	0,0042	0,0094
L3	1016	0,0873	0,0424	0,0952	0,0603	0,1039	0,1236	0,1879	0,1056	0,1281	0,1078	0,0832
	1260	0,0176	0,0220	0,0269	0,0198	0,0358	0,0399	0,0387	0,0216	0,0303	0,0335	0,0254
	5460	0,0165	0,0219	0,0268	0,0197	0,0342	0,0386	0,0383	0,0152	0,0338	0,0375	0,0212
L5	1016	0,7632	0,7157	0,7059	0,6310	0,8752	0,8524	0,7537	0,7187	0,4011	0,7757	0,7766

<b>1260</b>	0,9768	1,0048	0,8858	0,7595	1,0382	1,0162	0,8982	0,9381	0,5131	0,9437	0,9327
<b>5460</b>	1,1608	1,1985	1,0217	0,9223	1,2804	1,0191	1,0186	1,1706	0,6375	1,0886	1,1548

Tabella 7.14, Ripetizione acqua di scarico

Lo step successivo era di confrontare il CV% del metodo con quello ricavato in laboratorio, per il livello di concentrazione più vicino rispetto a quello riportato nella norma europea. Nella **Tabella 7.15** si riportano i valori SD e CV% del metodo e del lavoro sperimentale.

Analiti	GW L5				WW L5			
	metodo		validazione		metodo		validazione	
	SD [µg/L]	CV%	SD [µg/L]	CV%	SD [µg/L]	CV%	SD [µg/L]	CV%
<b>Aroclor 1016</b>	0,41	17,2	0,3996	16,6513	0,41	17,2	0,1267	17,4898
<b>Aroclor 1260</b>	0,41	17,2	0,2528	13,7377	0,41	17,2	0,1495	16,6016
<b>Aroclor 5460</b>	0,41	17,2	0,2124	10,5036	0,41	17,2	0,1739	16,3831

Tabella 7.15, Valori di SD e CV% di confronto per le differenti matrici

Il valore di CV % è stato calcolato per il confronto con il range di accettabilità, riportato nella **Sezione 6.2.3**. Ricordiamo l'intervallo relativo alla serie di 11 ripetute previsto dal manuale UNICHIM 179/1<sup>(70)</sup>:

$$0,57 < x < 1,431$$

Di seguito si riportano in **Tabella 7.16** i valori relativi al rapporto tra CV%.

Analiti	GW L5	WW L5
<b>Aroclor 1016</b>	0,968	1,017
<b>Aroclor 1260</b>	0,799	0,965
<b>Aroclor 5460</b>	0,611	0,953

Tabella 7.16, Rapporto tra CV% metodo-laboratorio

I valori di CV% vengono impiegati per determinare l'incertezza composta relativa alle misure associate al livello di concentrazione preso in esame, assieme all'errore percentuale del titolo standard e all'errore sulle pesate. Per questo tipo di validazione, facente riferimento ad un metodo EPA, l'incertezza della taratura è subordinata alla verifica ICV con il 30 % di tolleranza massima sul campione di riferimento; il contributo di questa incertezza viene calcolato dunque come:



$$\text{Incertezza taratura (\%)} = \frac{30}{\sqrt{3}} = 17,32 \%$$

Si ricordano di seguito, da **Sezione 6.2.2**, le relazioni necessarie per il calcolo delle incertezze composta ed estesa:

$$\begin{aligned} & \text{Incertezza composta (\%)} \\ & = \sqrt{(CV\%)^2 + (\text{Incertezza taratura \%})^2 + (\text{Incertezza titolo})^2 + (\text{Incertezza pesata})^2} \end{aligned}$$

$$\text{Incertezza estesa (\%)} = k * \text{Incertezza composta (\%)}$$

Successivamente al calcolo, si riportano i valori delle incertezze (**Tabelle 7.17 e 7.18**) relative alla procedura di validazione per le differenti matrici.

Analiti	CV%	Incertezza di Taratura (%)	Incertezza Titolo Standard (%)	Incertezza Composta (%)	Incertezza Estesa (%)
<b>Aroclor 1016</b>	16,6513	17,32	4,32	24,41	48,8
<b>Aroclor 1260</b>	13,7377	17,32	4,32	22,52	45,0
<b>Aroclor 5460</b>	10,5036	17,32	4,32	20,71	41,4

Tabella 7.17, Incertezze GW L5

Analiti	CV%	Incertezza di Taratura (%)	Incertezza Titolo Standard (%)	Incertezza Composta (%)	Incertezza Estesa (%)
<b>Aroclor 1016</b>	17,4898	17,32	4,32	24,99	50,0
<b>Aroclor 1260</b>	16,6016	17,32	4,32	24,38	48,8
<b>Aroclor 5460</b>	16,3831	17,32	4,32	24,23	48,5

Tabella 7.18, Incertezze WW L5

Come si può notare, l'incertezza estesa relativa alle tre differenti matrici si trovano intorno ad un valore del 50 %.

Vista la natura costante dell'incertezza il Laboratorio applicherà, cautelativamente, il valore maggiore delle tre incertezze, esprimendo il risultato mediante la forma  $XXX \pm YYY \mu\text{g/L}$ .

Terminata la procedura di validazione si compila il Workflow preparativo ufficiale del metodo, illustrato in **Appendice 9.2**.

### 7.3 Test di ottimizzazione

Allo scopo di limitare le impurezze nelle analisi dei composti Aroclor, è stata eseguita una ricerca bibliografica dei metodi di estrazione liquido-liquido per i composti PCB con analisi in ECD. Infine, si è valutata l'idea di provare un nuovo solvente, analizzandone uno *green*.

Nell'ultimo ventennio si sono cercate soluzioni a problemi di rischio ambientale e della salute umana, oltre a problemi economici/sociali riscontrati in molti processi industriali. La *green chemistry* nasce dal pensiero costante di limitare questi rischi introducendo un nuovo approccio che si basa sulla sicurezza e sulla prevenzione. Si focalizza su 12 principi che identificano ogni singolo componente del sistema di una reazione chimica coniugandoli in una visione innovativa<sup>(78)</sup>.

I principi sono<sup>(79)</sup>:

- 1- Prevenzione degli scarti
- 2- Massima economia atomica
- 3- Sintesi chimiche meno pericolose
- 4- Progettazione di composti chimici salubri
- 5- Minimizzare l'uso di solventi e di sostanze ausiliarie
- 6- Incrementare l'efficienza energetica
- 7- Utilizzare materie prime rinnovabili
- 8- Ridurre la formazione di derivati non necessari
- 9- Uso di catalizzatori
- 10- Progettazione per la degradazione
- 11- Analisi in tempo reale per la prevenzione dall'inquinamento
- 12- Utilizzo di sostanze chimiche sicure per la prevenzione di incidenti

Nel vasto panorama dei solventi *green* l'azienda Carlo Erba Reagents<sup>(80)</sup> offre il ciclopentil metil etere CPME (**Figura 7.11**).

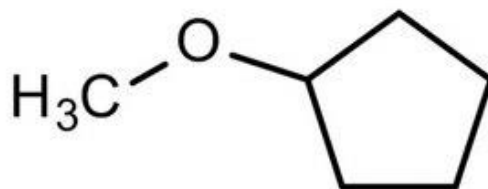


Fig. 7.11, Struttura ciclopenti metil etere

La scelta di questo solvente alternativo è stata dettata da una serie di caratteristiche tra cui la limitata solubilità in acqua, come riportato in **Figura 7.12**.

	CAS	PM (g/mol)	d 20°C (g/cm <sup>3</sup> )	b.p. [°C]	m.p. [°C]	Punto di infiammabilità [°C]	Viscosità (20°C) [cP]	Indice di Rifrazione (20°C)	Costante dielettrica (25°C)	Solubilità in acqua (23°C) [g/100g]	Solubilità dell'acqua nel solvente (23°C) [g/100g]	Punto Azeotropico con acqua [°C]	Intervallo di esposizione [vol%] (limite inferiore)	Intervallo di esposizione [vol%] (limite superiore)
MeTHF	96-47-9	86,14	0,85	80	-136	-11	0,46 (25°C)	1,41	7	14	4,4	71	1,5	8,9
1,3-propandiolo	504-63-2	76,1	1,05	214	-26,7	129	0,52	1,44	—	∞	∞	—	2,6	16,6
<b>CPME</b>	<b>5614-37-9</b>	<b>100,16</b>	<b>0,86</b>	<b>106</b>	<b>&lt;-140</b>		<b>0,55</b>	<b>1,42</b>	<b>4,76</b>	<b>1,1</b>	<b>0,3</b>	<b>83</b>	<b>1,1</b>	<b>9,9</b>
DMPU	7226-23-5	128,18	1,06	246	-23	120	—	1,49	—	—	—	—	—	—
1,3-Diossolano	646-06-0	74,08	1,07	75,6	-95	-6	0,6 (25°C)	1,40	7,34	∞	∞	71 (*)	2,1	20,5
MTHP	4717-96-8	100,16	0,86	105	-70	6,5	0,78	—	—	1,5	1,4	84,5	—	—
DMF	68-12-2	73,10	0,95	153	-61	58	0,80	1,42	—	∞	∞	—	2,2	16
NMP	872-50-4	99,13	1,03	202	-24	93	1,65	1,47	—	∞	∞	—	1,3	9,5
MEK	78-93-3	72,11	0,81	79,6	-86	-5	0,39	1,38	18	22,6	9,9	—	1,8	11,5
THF	109-99-9	72,11	0,89	65	-108,5	-14,5	0,55	1,41	7,58	∞	∞	74	1,84	11,8
Dietilere	60-29-7	74,12	0,71	34,6	-116,3	-45	0,245	1,35	4,20	6,5	1,2	34,2	1,85	48
Diossano	123-91-1	88,11	1,03	101	11,8	12	1,31	1,42	2,23	∞	∞	87,8	1,6	8,4
MTBE	1634-04-4	88,15	0,74	55	-108,7	-28	—	1,37	2,6	4,8	1,5	53	2	22
Diclorometano	75-09-2	84,93	1,32	39,6	-97	—	0,43	1,42	11	1,32	0,14	—	13	22

Fig. 7.12, Confronto caratteristiche tra solventi comuni e green<sup>(79)</sup>

Inoltre, i vantaggi del ciclopentil metil etere, rispetto ad altri eteri<sup>(79)</sup>, sono:

- Maggiore stabilità in ambiente acido e basico;
- Elevato punto di ebollizione;
- Limitata solubilità in acqua;
- Bassa volatilità e tossicità;
- Ridotta formazione di perossidi.

Come primo step, nell'analisi di questo nuovo solvente, sono state preparate 2 prove ripetibili del livello 5 e un campione *solvent blank* per analizzare la differenza di rumore di fondo. Successivamente, sono state preparate ulteriori quattro prove al livello 3 (vedi **Tabella 7.1**) di concentrazione, differenziate nella fase di purificazione.

- 1° prova: la purificazione non è stata eseguita in silice, ma utilizzando una cartuccia C18 aggiungendo 2 grammi di Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;
- 2° prova: si è impiegata una colonnina in vetro contenente 2 grammi di Florisil;

- 3° prova: non è stata eseguita nessuna purificazione, sono stati aggiunti solamente 2 grammi di  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ;
- 4° prova: procedendo in diclorometano, concentrando a secco e infine riprendendo in eptano, per la purificazione è stata usata una cartuccia in silice con 2 grammi di  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Tuttavia, durante queste prove è stato possibile notare quanto questo nuovo solvente *green* fosse maggiormente difficile da estrarre dopo la riequilibrio della miscela a seguito dell'agitazione magnetica. Visto la difficoltà, il ciclopentil metil etere è stato abbandonato per questa validazione. Non si esclude che possa prossimamente tornare utile come solvente per altre applicazioni in laboratorio.

## 8 Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono stati studiati metodi gascromatografici. Sono stati presi a riferimento i metodi ISO o EPA esaminando nello specifico le relative procedure preparative del campione.

Per entrambe le validazioni (per OTC vedi **Capitolo 6** e PCB vedi **Capitolo 7**) è stata effettuata una estrazione liquido-liquido, LLE, (vedi **Sezione 4.1**). L'introduzione di questa tecnica analitica ha portato numerosi vantaggi rispetto all'impiego dell'estrazione in fase solida SPE (vedi **Sezione 4.2**), già utilizzata nel Laboratorio. Nonostante SPE sia tuttora preferibile per alcune analisi, con la tecnica LLE è stato possibile standardizzare maggiormente le operazioni di preparazione del campione, andando a ridurre tempi e costi della procedura.

I due metodi introducono ulteriori semplificazioni nell'*iter* preparativo utilizzando volumi ridotti di campione e di solvente rendendo la fase di concentrazione dell'estratto finale più rapida. L'estrazione è stata favorita impiegando un bagno ad ultrasuoni presente nel laboratorio aziendale.

Il primo metodo, riguardante gli OTC (**Capitolo 6**), è stato studiato per tre matrici acquose differenti (acqua potabile, sotterranea e di scarico) su quattro livelli di concentrazione. Per ognuna di queste matrici è stato confrontato il CV% del metodo normato con quello ricavato in laboratorio, prendendo in riferimento il livello di concentrazione più vicino a quello riportato nella norma stessa. Il rapporto tra i CV% tra valore ottenuto e valore del metodo normato (UNICHIM 179/1<sup>(70)</sup>), ha permesso di verificare la bontà della validazione. Infine, è stata valutata l'incertezza estesa delle tre matrici, pari al 39,2% per MBT.

Il secondo metodo, relativo ai PCB (**Capitolo 7**), è stato studiato per due matrici acquose (acqua sotterranea e di scarico) su cinque livelli di concentrazione differenti. Il quinto livello è stato aggiunto dopo una ricerca bibliografica, la quale ha portato a incrementare la concentrazione in esame per un miglior confronto con la norma. Dunque, il confronto di CV% è stato effettuato su questo livello di concentrazione seguendo l'intervallo di compatibilità per la serie di ripetute. Infine, è stata calcolata l'incertezza estesa delle due matrici, pari al 50,0 % per Aroclor 1016.

Per i PCB sono stati eseguiti dei test di ottimizzazione (vedi **Sezione 7.3**), allo scopo di limitare impurezze nelle analisi dei composti Aroclor. Le prove si sono concentrate su un solvente *green*, il ciclopentil metil etere CPME, scelto per una serie di caratteristiche tra cui la limitata solubilità in acqua. Inoltre, sono stati eseguiti dei test variando le tecniche di purificazione. Tuttavia, si è evidenziata la difficoltà di estrazione del nuovo solvente, portando ad abbandonare il ciclopentil metil etere per questa validazione.

## 9 Appendici

### 9.1 Workflow ufficiale OTC

**AGROLAB Italia S.r.l.**

«cwaDocumentNumber»

Versione: «cwaDocumentVersion»

Valido da: «cwaDocumentValidFrom»



Pag. 1 di 1

«cwaDocumentName»

«cwaDocumentDescription»

**METODO : ISO 17353:2006**

**ANALISI : COMPOSTI ORGANICI DELLO STAGNO**

**MATRICE : ACQUE**

#### WORKFLOW PREPARATIVO

##### 1 – PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DI PROVA

- Pesare il campione in una vial in vetro da 60 mL
- Aggiungere, con micropipetta n° 3193/3300/3339, **200 µL di Acido Acetico** (pH = 4)
- Aggiungere, con micropipetta n° 3299/3300, **100 µL di surrogato OTC** (STOCK SOLUTION B) a **1 ppm**

##### 2 – ESTRAZIONE

- Sonicare in bagno ultrasuoni n°2243 per 30 minuti

##### 3 – DERIVATIZZAZIONE 1° STEP:

- Aggiungere **2,5 mL** di agente derivatizzante **NaBEt<sub>4</sub>** al 4% in H<sub>2</sub>O
- Aggiungere **2,5 mL** di **eptano** come agente estraente
- Agitare 45 minuti su scuotitore Multireax n°1661 a 800 rpm (velocità 5)
- Permettere alle fasi di riequilibrarsi
- Prelevare la fase organica superiore e trasferire in provetta da 10 mL
- Aggiungere **1 spatola di sodio solfato anidro**
- Prelevare 1 mL e trasferire in vial da autocampionatore

##### 4 – PURIFICAZIONE (ove necessario):

Preparare una colonnina in vetro con

- **5 g** di silice e **3 g** di **sodio solfato anidro**
- Condizionare con **30 mL** di **eptano**
- Trasferire il campione.
- Eluire con **50 mL** di **soluzione eluente** e raccogliere in vial da 60 mL
- Concentrare in Turbovap n°3187a **1 mL** sotto gentile flusso di azoto impostando la temperatura del bagno a **non oltre 35°C**

##### 5 – AGGIUNTA STANDARD INTERNO

- Aggiungere, con micropipetta n° 3303/3301, **10 µl** di **MIX ISTD OTC** a **5 ppm**

In caso l'estratto necessiti di diluizione (a causa per esempio del colore scuro o di presenza di particolato), il campione va diluito DOPO l'aggiunta dello standard interno e quest'ultimo non va reiniettato!!!! La diluizione va in ogni caso segnalata al reparto strumentale.

#### Ad ogni lotto preparativo di massimo 20 campioni:

##### LCS -Laboratory Control Standard :

Aggiungere a **50 mL** di acqua Levissima, con micropipetta n° 3299/3300, **100 µL** di **MIX LCS OTC** (STOCK SOLUTION A), poi seguire la procedura descritta dal punto 1 al punto 5.

##### MB – Metod Blank :

Eseguire la procedura di preparazione del campione su **50 mL** di **acqua Levissima**.

##### CCV –Continuing Calibration Verification :

Preparare uno standard a concentrazione nota pari al punto 3 della curva di taratura.

«TableStart:cwaDocume  
ntEditors»«cwaDocumen  
tEditType»

«cwaDocumentEditorName»

«cwaDocumentEditD  
ate»«TableEnd:cwa  
DocumentEditors»

## 9.2 Workflow ufficiale PCB

### AGROLAB Italia S.r.l.

«cwaDocumentNumber»

Versione: «cwaDocumentVersion»

Valido da: «cwaDocumentValidFrom»

«cwaDocumentName»

«cwaDocumentDescription»



Pag. 1 di 1

**METODO : EPA 3510C**  
**ANALISI : Aroclor**  
**MATRICE: Acque**

### WORKFLOW PREPARATIVO

#### 1 – Pesata campione

Pesare in bilancia tecnica la bottiglia contenente il campione

#### 2 - Trattamento del campione:

- Aggiungere, con micropipetta n° 3299/3301, **25 µL di surrogato PCB 209 a 200 µg/L**
- Aggiungere, con micropipetta n° 3299/3301, **20 µL di Dodecano**
- Aggiungere **10 ml di Eptano**
- Agitazione vigorosa manuale per almeno 10 secondi
- Sonicare per 5 minuti in bagno ultrasuoni n°2243
- Aggiunge 3 spatole di NaCl
- Agitare con agitatore magnetico con ancoretta per 30 minuti a 700 rpm.
- Prelevare con pipetta l'eptano in superficie e trasferirlo in provetta da 10 ml

#### 3 – Concentrazione estratto:

- **Concentrare l'estratto fino a 0.5 mL** con Turbovap n° 3187 sotto leggero flusso di azoto e temperatura massima di 40°C
- Aggiungere, con micropipetta n° 3299/3301, **10 µL di standard interno 2,4,5,6-Tetracloro-m-xilenea 0.1 mg/L**
- Trasferire l'estratto in vial da autocampionatore

#### 1 – Retropesatura campione

- Pesare in bilancia tecnica la bottiglia vuota

#### Ad ogni lotto preparativo di massimo 20 campioni:

**LCS/LCSD -Laboratory Control Standard/Duplicate :**

In 500 mL di acqua Levissima aggiungere con micropipetta n°3299/3301:

- 25 µl di mix PCx LCS ACQUE a 0,5 mg/L in acetone**

ed eseguire la preparazione così come esposta dal punto 1 al punto 3

**MB – Method Blank :**

- Eseguire la stessa preparazione effettuata per i campioni su 500 mL di acqua Levissima.

«TableStart:cwaDocumen  
tEditors»«cwaDocumen  
tEditType»

«cwaDocumentEditorName»

«cwaDocumentEditD  
ate»«TableEnd:cwa  
DocumentEditors»



## 10 Bibliografia

- (1) Leonardo Salvemini, AmbienteDiritto, *La tutela dell'acqua*, online: [https://www.ambientediritto.it/dottrina/Dottrina\\_2010/tutela\\_acqua\\_salvemini.htm](https://www.ambientediritto.it/dottrina/Dottrina_2010/tutela_acqua_salvemini.htm)
- (2) Giorgio Cancelliere, Treccani Online, *L'oro blu: la battaglia per l'acqua*, online: [http://www.treccani.it/enciclopedia/l-oro-blu-la-battaglia-per-l-acqua\\_%28XXI-Secolo%29/](http://www.treccani.it/enciclopedia/l-oro-blu-la-battaglia-per-l-acqua_%28XXI-Secolo%29/)
- (3) Nazioni Unite, *Agenda 2030*, online: <https://unric.org/it/agenda-2030/>
- (4) ENI, *Inquinamento dell'acqua*, online: <https://www.eniscuola.net/argomento/inquinamento-dellacqua/>
- (5) Direttiva 2000/60/CE, 23 ottobre 2000, in materia di “Acque”
- (6) Andrea Agapito Ludovici, Nicoletta Toniutti, Marzo 2006, WWF Italia, *La partecipazione pubblica nel governo delle acque*, Traduzione delle linee guida sulla partecipazione pubblica in relazione alla Direttiva 2000/60/CE, Edizione Multimediale e Pubblicità, pp 64
- (7) Allegato VIII, Gazzetta ufficiale delle Comunità europee, 22 dicembre 2000, L327, *Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio*, pp 72
- (8) Dossier Legambiente, Giornata Mondiale dell'Acqua, 22 marzo 2019, *Buone & Cattive Acque – Storia di falde, fiumi e laghi inquinati, ma anche di acque salvate*, pp 84
- (9) Dossier Legambiente, Giornata Mondiale dell'Acqua, 22 marzo 2019, *Buone & Cattive Acque – Storia di falde, fiumi e laghi inquinati, ma anche di acque salvate*, p 6
- (10) AGROLAB GROUP ITALIA, *Storia e Gruppo*, online: <https://www3.agrolab.com/it/il-gruppo/chi-siamo.html>
- (11) D.L. 13 ottobre 2015, n. 172, in materia di “Sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque”
- (12) Silvano Cavalli, Nicola Cardellicchio, 2005, *Il monitoraggio ambientale - Volume 2, Ambiente Marino – Metodologie Analitiche – Studio di ecosistemi*, p 208
- (13) Berto D., Boscolo Brusà R. (A cura di), ISPRA, QUADERNI – Ricerca Marina n. 8/2016, *I Composti Organostannici in ambiente marino e lagunare*, Roma, pp 117
- (14) Rapporto ARPAV, Maggio 2014, *Studio Triennale dell'accumulo di composti organostannici nell'ecosistema lagunare di Venezia – Rapporto finale*, pp 115
- (15) Warren T. Piver, Environmental Health Perspectives, 1973, *Organotin Compounds: Industrial Applications and Biological Investigation*, p 61-79
- (16) Rapporto ARPAV, Maggio 2014, *Studio Triennale dell'accumulo di composti organostannici nell'ecosistema lagunare di Venezia – Rapporto finale*, p 11
- (17) Nicola Cardellicchio, Santina Giandomenico, 2005, *La contaminazione da composti organostannici in un ecosistema marino*, Il monitoraggio ambientale II, Ambiente marino – Metodologie analitiche – Studio di ecosistemi, p 207
- (18) Rapporto ARPAV, *Studio Triennale dell'accumulo di composti organostannici nell'ecosistema lagunare di Venezia – Rapporto finale*, Maggio 2014, p 19

- (19) D.P.R. 10 settembre 1982, n. 904, in materia di “*Immissione sul mercato ed all’uso di talune sostanze e preparati pericolosi*”
- (20) Direttiva del Consiglio 27 luglio 1976, n. 76/769/CEE, in materia di “*Ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati Membri relative alle restrizioni in materia di immissione sul mercato e di uso di talune sostanze e preparati pericolosi*”
- (21) Gazzetta ufficiale delle Comunità europee, ISSN 0378-7028, L 398, 30 dicembre 1989, 32° anno, 19-23
- (22) Direttiva della Commissione 26 maggio 1999, n. 1999/51/CE, in materia di “*Adeguamento per la quinta volta al progresso tecnico l’allegato I della direttiva 76/769/CEE*”
- (23) Direttiva della Commissione 9 luglio 2002, n. 2002/62/CE, in materia di “*Adeguamento per la nona volta al progresso tecnico l’allegato I della direttiva 76/769/CEE*”
- (24) Reg. 14 aprile 2003, n. 782/2003, in materia di “*Divieto dei composti organostannici sulle navi*”
- (25) Reg. 31 marzo 2010, n. 276/2010, in materia di “*Modifica del Reg. (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l’autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) per quanto riguarda l’allegato XVII (diclorometano, oli per lampade, liquidi accendigrill e composti organostannici)*”
- (26) Ministero dell’ambiente e della tutela del territorio e del mare, ottobre 2010, *Sostanze chimiche – Ambiente e salute Il REACH e altre normative in materia di prodotti chimici*, Anno 1 – numero 2, bollettino di informazione n. 2
- (27) Organizzazione internazionale per la navigazione marittima (IMO), 2020, online: [www.imo.org](http://www.imo.org)
- (28) U.S. Department of Health and Human Services, Novembre 2000, *Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs)*, Capitolo 4, p 443-466, online: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp17.pdf>
- (29) Dianne L. Poster, Michele M. Schantz, Stefan D. Leigh, and Stephen A. Wise, *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, Volume 109, Number 2, March-April 2004, pp 245-266
- (30) APAT Agenzia per la protezione dell’ambiente e per i servizi tecnici, 2006, *Diossine Furani e PCB*, pp 74
- (31) Battelle Memorial Institute, GeoChem Metrix Inc., U.S. Navy SPAWAR Systems Center, U.S. Environmental Protection Agency ORD, Ottobre 2012, *A Handbook for Determining the Sources of PCB Contamination in Sediments*, Capitolo 2, pp 15-20
- (32) PubChem, Compound summary, *2,2’,3,3’,4,4’-Hexachlorobiphenyl*, online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/aroclor-1260>
- (33) APAT, IRSA-CNR, Manuali e Linee Guida 29/2003, *Metodi analitici per le acque*, Volume Primo, pp 1153

- (34) Istituto Superiore di Sanità, Womenbiopop, *Gli inquinanti - Policlorobifenili*, online: <https://old.iss.it/womenbiopop/?lang=1&id=417&tipo=6>
- (35) Arpa Piemonte, *Diossine, PCB, IPA - Guida alla lettura dei risultati analitici*, online: <http://www.arpa.piemonte.it/approfondimenti/temi-ambientali/microinquinanti/Diossine%2C%20PCB%2C%20IPA%20-%20guida%20alla%20lettura%20dei%20risultati%20analitici>
- (36) World Health Organization, Bergman, Heindel, Jobling, Kidd, Zoeller, 2012, *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals*
- (37) Endocrine Society, Andrea Gore, David Crews, Loretta Doan, Michele La Merrill, Heather Patisaul, Ami Zota, Dicembre 2014, *Introduction to endocrine disrupting chemicals (EDCs)*, pp 69
- (38) ARPA, Relazioniamoci, 2012, *Contaminazione da PCB e diossine nel suolo e nell'aria: la situazione in Umbria e il confronto con il dato nazionale*, online: <https://www.arpa.umbria.it>
- (39) Secretariat of the Stockholm Convention (SSC), Revisione 2017, *Stockholm Convention – on Persistent Organic Pollutants (POPs)*, Text and Annexes, pp 78, online: <https://www.pops.int/TheConvention/Overview/TextoftheConvention/tabid/2232/Default.aspx>
- (40) *La Convenzione di Stoccolma: inquinanti organici persistenti*, 2016, Online: <https://www.certifico.com/chemicals/legislazione-chemicals/271-regolamento-pops/2161-la-convenzione-di-stoccolma-inquinanti-organici-persistenti>
- (41) Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea, 31/7/2006, L209/3-29, traduzione italiana, *Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti*, Allegati A B e C, pp 27
- (42) Secretariat of the Stockholm Convention (SSC), Revisione 2017, *Stockholm Convention – on Persistent Organic Pollutants (POPs)*, Text and Annexes, p 45-46, online: <https://www.pops.int/TheConvention/Overview/TextoftheConvention/tabid/2232/Default.aspx>
- (43) Reg. 2 dicembre 2011, n. 1259/2011, in materia di “*Modifica Reg. (CE) n. 1881/2006 per quando riguarda i tenori massimi per i PCB diossina-simili e i PCB non diossina-simili nei prodotti alimentari*”
- (44) Reg. 28 marzo 2012, n. 277/2012, in materia di “*Modifica gli allegati I e II della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi e le soglie d'intervento relativi alle diossine e ai policlorobifenili*”
- (45) Presentazione power point, *Estrazione liquido/liquido*, online: [https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=http://nucciocama.xoom.it/materiale\\_5\\_bh/ESTRAZIONE%2520LIQUIDO\\_LIQUIDO.pdf&ved=2ahUKEwiDhJ34s7qAhUTwsQBHerTCXEQFjAJegQIAxAB&usg=AOvVaw2baPVt96QpyFxcRwTU3WgR](https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=http://nucciocama.xoom.it/materiale_5_bh/ESTRAZIONE%2520LIQUIDO_LIQUIDO.pdf&ved=2ahUKEwiDhJ34s7qAhUTwsQBHerTCXEQFjAJegQIAxAB&usg=AOvVaw2baPVt96QpyFxcRwTU3WgR)
- (46) Presentazione power point, *Estrazione liquido-liquido*, online: [https://moodle2.units.it/pluginfile.php/131092/mod\\_resource/content/1/estrazione.pdf](https://moodle2.units.it/pluginfile.php/131092/mod_resource/content/1/estrazione.pdf)
- (47) Springer Link, *Estrazione in fase solida (SPE)*, online: [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-88-470-5738-8\\_6](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-88-470-5738-8_6)

- (48) Presentazione power point, *SPE – Master Reach*, online: <https://www.masterreach.unina.it>
- (49) Libero Digiland, *Applicazione dei MIPs - Estrazione in Fase Solida (SPE)*, online: [https://digilander.libero.it/Imprinted\\_Polymers/MIPs/SPE.htm](https://digilander.libero.it/Imprinted_Polymers/MIPs/SPE.htm)
- (50) Presentazione power point, *Tecniche di estrazione-preconcentrazione*, online: [http://www.masterreach.unina.it/Lezioni%202013\\_2014/Analischimicatossicologica/05-Analisi%20chimica%20tossicologica-Prof.%20Perissutti-Dr.%20Frecentese.pdf](http://www.masterreach.unina.it/Lezioni%202013_2014/Analischimicatossicologica/05-Analisi%20chimica%20tossicologica-Prof.%20Perissutti-Dr.%20Frecentese.pdf)
- (51) Presentazione power point, *Estrazione con solventi*, online: <https://people.unica.it/lauracasu/files/2012/03/3.-Estrazione-icone-solventi3.pdf>
- (52) Gregori E, Patriarca M, Segà M (Ed.), Guida Eurachem, Seconda edizione 2014, *Idoneità per lo scopo dei metodi analitici - Guida per i laboratori sulla validazione dei metodi e argomenti correlati*, Traduzione italiana, Roma: Istituto Superiore di Sanità, Rapporti ISTISAN 16/39
- (53) Validazione - master reach, *Garanzia di Qualità dei risultati analitici*, online: [www.masterreach.unina.it](http://www.masterreach.unina.it)
- (54) APAT, RTI CTN\_SSC 3/2002, *Guide tecniche su metodi di analisi e di monitoraggio - Proposta di Guida Tecnica sui metodi di analisi dei suoli contaminati*, pp 6-7
- (55) Marina Patriarca, Ferdinando Chiodo, Federica Corsetti, Barbara Rossi, Antonio Menditto, Michela Segà e Margherita Plassa, Istituto Superiore di Sanità, 2000, *Quantificazione dell'incertezza nelle misure analitiche*, Seconda edizione Guida EURACHEM/CITAC CG 4, pp 119, Rapporti ISTISAN 03/30
- (56) Presentazione power point, *5.4. Metodi di prova e validazione – Accredia*, online: <https://www.accredia.it>
- (57) Norma europea UNI EN ISO 17353:2006, in materia di “*Determinazione di composti organici dello stagno selezionati, Metodo gascromatografico*”
- (58) Carl Roth, 2019, *Scheda dati di sicurezza - Eptano*
- (59) Carl Roth, 2018, *Scheda dati di sicurezza - Acido Acetico*
- (60) Carl Roth, 2019, *Informazioni di sicurezza volontarie conformi al formato della scheda dati di sicurezza ai sensi del Regolamento CE 1907/2006 (REACH) - Solfato di sodio*
- (61) ChemWhat, *Scheda dati di sicurezza - Sodio tetraetilborato*, online: <https://www.chemwhat.it/tetraetilborato-di-sodio-cas-15523-24-7/>
- (62) Carl Roth, 2019, *Informazioni di sicurezza volontarie conformi al formato della scheda dati di sicurezza ai sensi del Regolamento CE 1907/2006 (REACH) - Acetato di sodio*
- (63) Agilent, UltraScientific Italia, 2019, *Certificate of Analysis ISO Guide 34 – ISO 17353/26131 Organotin (OC) Cal STD Mix - Stock Soln A*
- (64) Agilent, UltraScientific Italia, 2018, *Certificate of Analysis ISO Guide 34 - ISO 17353/26131 Organotin (OC) Intrnl STD Mix - Stock Soln B*
- (65) Agilent, UltraScientific Italia, 2018, *Certificate of Analysis ISO Guide 34 – ISO 17353/26131 Organotin (OC) Inject STD Soln - Stock Soln C*

- (66) Supelco, 2019, *Scheda di dati di sicurezza – Modificatore di matrice*, pp 7
- (67) ARPAV, Sanzioni protezione acque, Giornata di aggiornamento personale di polizia locale, *Tutela delle acque dall'inquinamento*, online: <https://www.arpa.veneto.it>
- (68) Giuliano Dal Magro, Tesi di laurea, Università degli Studi di Padova, Facoltà Scienze MM.FF.NN., 2009-2010, *Determinazione del 2,5-esandione libero urinario per la valutazione dell'esposizione a n-esano*, pp 62
- (69) EPA, 2018, *EPA 8000D*, USA
- (70) UNICHIM, Manuale 179/1, Edizione 2011, *Linee guida per la convalida di metodi analitici nei laboratori chimici – Valutazione della precisione (ripetibilità stretta) di un metodo analitico eseguito in un unico laboratorio da un solo operatore su di un unico strumento in un breve intervallo di tempo*, Prospetto 2, p 60
- (71) EPA, 1996, in materia di “*Method 3510C – Separatory funnel liquid-liquid extraction*”
- (72) Carl Roth, 2019, *Scheda dati di sicurezza – Dodecano*
- (73) Agilent Technologies, 2019, *Scheda dati di sicurezza – Cloruro di sodio*, pp 13
- (74) Presentazione power point, *GC-GC/MS*, online: [https://www.eurekaone.com/wp-content/uploads/2004/08/258\\_GCMS.pdf](https://www.eurekaone.com/wp-content/uploads/2004/08/258_GCMS.pdf)
- (75) Master Reach, Presentazione power point, *Metodi cromatografici – Rivelatori*, online: [http://www.masterreach.unina.it/Lezioni%202013\\_2014/Analischimicatossicologica/08-Analisi%20chimica%20tossicologica-Prof.%20Perissutti-Dr.%20Frecentese.pdf](http://www.masterreach.unina.it/Lezioni%202013_2014/Analischimicatossicologica/08-Analisi%20chimica%20tossicologica-Prof.%20Perissutti-Dr.%20Frecentese.pdf)
- (76) EPA, 2015, EPA 8082A, in materia di “*Polychlorinated biphenyls (PCBs) by gas chromatography*”
- (77) Presentazione power point, Capitolo 15, *Incertezza della misura*, Impatto ambientale dei campi elettromagnetici, online: [https://mwl.diet.uniroma1.it/IACEm/15\\_incertezza.pdf](https://mwl.diet.uniroma1.it/IACEm/15_incertezza.pdf)
- (78) Ugo Romano, Franco Rivetti, Enciclopedia Treccani, *Industria chimica e sviluppo sostenibile*, Enciclopedia degli idrocarburi, Volume III – Nuovi sviluppi: energia, trasporti, sostenibilità, p 879-912
- (79) Carlo Erba Reagents, 2014, *Chimica Verde, Solventi – Sicurezza e Qualità*, Dasit Group, pp 7
- (80) Carlo Erba Reagents, online: <https://www.carloerbareagents.com/it/chi-siamo>