

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**SVILUPPO DI METODI PER LA DETERMINAZIONE DI ACIDI ALOACETICI E
INTERFERENTI ENDOCRINI IN OTTEMPERANZA ALLA DIRETTIVA
EUROPEA 2020/2184**

Relatore: Prof. Fernando Formaggio
Correlatore: Dott. Mauro Placido Fallica
Controrelatore: Prof. Denis Badocco

LAUREANDO: Ettore Retis

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

Sigle e abbreviazioni	III
1 Introduzione.....	1
1.1 Acqua: l'oro blu	1
1.2 Il laboratorio	5
2 Direttiva Europea 2020/2184.....	7
3 Inquinanti dell'acqua.....	9
3.1 Acidi aloacetici	9
3.1.1 Struttura e proprietà	9
3.1.2 Origine ed usi.....	11
3.1.3 Tossicità.....	12
3.1.4 Immissione.....	14
3.2 Interferenti endocrini	15
3.2.1 Struttura e proprietà	16
3.2.2 Origine ed usi.....	18
3.2.3 Tossicità.....	19
3.2.4 Immissione.....	20
4 Validazione di un metodo analitico	23
5 Scopo della Tesi.....	29
6 Sostanze e strumenti.....	31
6.1 Sostanze utilizzate	31
6.2 Apparecchiature utilizzate	33
7 HAAS.....	35
7.1 Metodo sviluppato	35
7.1.1 Procedura sperimentale.....	35
7.1.2 Analisi strumentale.....	37
7.2 Risultati e discussione.....	39
7.2.1 Calibrazioni	39
7.2.2 Errori e incertezze.....	47
7.2.3 Validazione	50

8 Interferenti endocrini	61
8.1 Metodo sviluppato	61
8.1.1 Procedura sperimentale	61
8.1.2 Analisi strumentale	63
8.2 Risultati e discussione	64
8.2.1 Calibrazioni.....	64
8.2.2 Errori ed incertezze	70
8.2.3 Validazione.....	72
9 Conclusione.....	81
10 Appendici.....	83
10.1 Workflow ufficiale acidi aloacetici	83
10.2 Workflow ufficiale interferenti endocrini	84
11 Bibliografia	85

Sigle e abbreviazioni

BCAA: BromoChloroAcetic Acid
BPA: BisPhenol A
CCV: Continuing Calibration Verification
CV: Coefficiente di Variazione
DBAA: DiBromoAcetic Acid
DBPs: Disinfection By-Products
DCAA: DiChloroAcetic Acid
EDTA: EthyleneDiamine Tetraacetic Acid
ESI: ElettroSpray Ionization
GC: Gas Chromatography
HAAS: HaloAcetic AcidS
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
ICV: Independent Calibration Verification
IE: Interferenti Endocrini
LC: Liquid Chromatography
LCS: Laboratory Control Sample
LCSD: Laboratory Control Sample Duplicate
LOD: Limit of Detection
LOQ: Limit of Quantification
MB: Method Blank
MBAA: MonoBromoAcetic Acid
MCAA: MonoChloroAcetic Acid
MDL: Method Detection Limit
MeOH: metanolo
MRM: Multiple Reaction Monitoring
MS: Mass Spectrometry
MS: Matrix Spike
MSD: Matrix Spike Duplicate
PVC: PolyVinylChloride
RL: Reporting limit
RSD: Relative Standard Deviation

SD: Standard Deviation

SVOC: Semi-Volatile Organic Compounds

TCAA: TriChloroAcetic Acid

THM: TriHaloMethanes

TS: TermoSpray

VOC: Volatile Organic Compounds

WFD: Water Framework Directive

1 Introduzione

Il lavoro di ricerca riportato in questa tesi è stato stimolato da recenti normative europee che chiedono di verificare se nelle acque potabili siano presenti sei particolari acidi aloacetici e due interferenti endocrini, il 17- β -estradiolo e il bisfenolo A. Pertanto, nelle sezioni introduttive si forniranno nozioni sulla direttiva europea di riferimento, sugli inquinanti dell'acqua da ricercare, sul processo di validazione di un metodo analitico e sul laboratorio dove si sono potuti sviluppare i metodi riportati in questa tesi.

1.1 Acqua: l'oro blu

Da sempre l'acqua riveste un ruolo indispensabile per tutti gli organismi viventi oltre ad essere una risorsa socioeconomica di fondamentale importanza. Il nostro pianeta è in gran parte coperto d'acqua ma soltanto il 2,5% di essa è dolce di cui:

- Il 68,9% si trova sotto forma di neve e ghiaccio nelle regioni polari;
- Il 30,5% si trova come acqua sotterranea;
- Lo 0,6% si presenta come acqua superficiale.

In sostanza, soltanto l'1% del totale di questa risorsa è effettivamente utilizzabile, rendendo necessario un controllo efficiente che garantisca questa preziosa risorsa alle future generazioni^[1]. A causa di fenomeni come l'aumento demografico, la diminuzione delle risorse, i cambiamenti climatici e l'inquinamento, l'acqua viene spesso definita "oro blu".

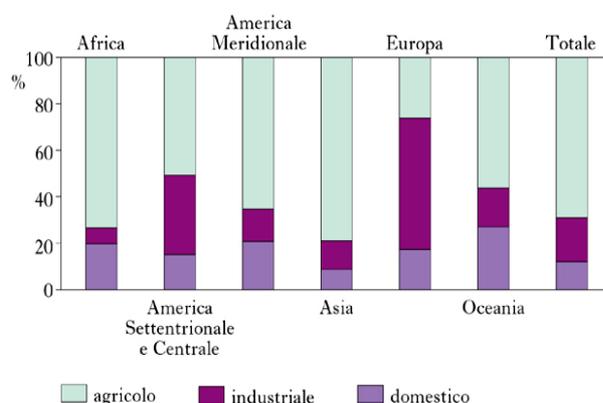


Figura 1.1: Utilizzi dell'acqua nelle diverse regioni del mondo.

L'acqua potabile ha svariate applicazioni nei settori agricolo (70%), industriale (20%) e domestico (10%). Come riportato dal Pacific Institute (**Figura 1.1**)^[2] vi sono differenti consumi di acqua a seconda delle diverse regioni del mondo.

Nel corso degli anni varie organizzazioni internazionali hanno presentato diverse iniziative con lo scopo di tutelare le risorse idriche. Una tra le più importanti è "Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile", che nel 2015 è stata sottoscritta dai 193 Paesi membri dell'ONU. Tale Agenda presenta 17 obiettivi che questi paesi si impegnano a raggiungere entro il 2030. Uno dei target riportati nell'Agenda è l'acqua (numero 6)^[3]. Ci si pone l'obiettivo di migliorarne la qualità e la gestione oltre che renderla universalmente accessibile. In **figura 1.2** è riportato l'obiettivo n°6 dell'agenda.



Figura 1.2: Obiettivo 6 dell'Agenda 2030

La contaminazione dell'acqua rappresenta una delle maggiori preoccupazioni legate a questa risorsa. Si verifica quando vi sono alterazioni chimiche, fisiche o biologiche che influiscono sulla qualità dell'acqua, generando conseguenze negative per la salute umana e l'ambiente. I diversi usi dell'acqua comportano tipi di inquinamento distinti, tra cui i più significativi sono:

- *Inquinamento di origine domestica*: si verifica attraverso lo scarico delle acque reflue domestiche, che contengono elevate quantità di sostanze organiche e saponi.
- *Inquinamento di origine agricola*: deriva dall'uso eccessivo e spesso improprio di pesticidi e fertilizzanti nell'agricoltura, i quali si accumulano nel terreno e nelle falde acquifere.

- *Inquinamento di origine industriale*: si manifesta quando le attività industriali scaricano nell'acqua sostanze pericolose in quantità superiori ai limiti consentiti dalle relative normative. ^[4]

Al fine di tutelare la qualità dell'acqua, il 23 ottobre 2000 il Parlamento Europeo e il Consiglio dell'Unione Europea hanno varato la Direttiva Quadro Acque 2000/60/CE. ^[5]

Questa è comunemente nota come WFD (Water Framework Directive) ed è una direttiva chiave nel campo della gestione delle acque. Il suo obiettivo principale è raggiungere un "buono stato" delle acque superficiali e sotterranee. La WFD stabilisce un approccio integrato alla gestione delle risorse idriche, promuovendo la tutela e il miglioramento del loro stato ecologico e chimico. La direttiva stabilisce requisiti per la valutazione e il monitoraggio delle acque, la pianificazione dei bacini idrografici e la cooperazione tra gli Stati membri.

Prima ancora, il 3 novembre 1998, è stata varata dal Consiglio Europeo la Direttiva 98/83/CE che stabilisce gli standard minimi di qualità dell'acqua destinata al consumo umano. La direttiva si applica a tutte le acque potabili fornite per uso umano, sia tramite reti di distribuzione che attraverso cisterne o contenitori mobili.

L'obiettivo principale della direttiva è garantire un elevato livello di protezione della salute umana attraverso la fornitura di acqua potabile sicura e salubre. Essa stabilisce i parametri di qualità e i limiti massimi per una vasta gamma di contaminanti chimici, compresi composti organici, inorganici e microbiologici, che possono presentare un rischio per la salute umana se presenti in quantità superiori ai livelli consentiti.

La direttiva richiede agli Stati membri di effettuare controlli regolari sulla qualità dell'acqua potabile, tra cui il campionamento e la caratterizzazione fisica, chimica e microbiologica. Inoltre, gli Stati membri devono adottare misure appropriate per prevenire, ridurre o eliminare la contaminazione delle acque potabili e garantire un'informazione adeguata al pubblico riguardo alla qualità dell'acqua. ^[6]

In data 16 novembre 2020 l'Europarlamento ha approvato una nuova direttiva europea sulla qualità delle acque destinate al consumo umano (Direttiva 2020/2184). La nuova Direttiva (UE) 2020/2184 apporta sostanziali modifiche rispetto alla direttiva 98/83/CE, che per oltre vent'anni è stata il riferimento a livello europeo sulla qualità dell'acqua potabile. ^[7]

Tra le principali aree oggetto di revisione evidenziamo:

- nuovo elenco dei parametri;
- l'implementazione di un approccio basato sull'analisi del rischio;
- valutazione della rete idrica interna agli edifici;
- migliorare l'accesso all'acqua;
- la regolamentazione della tipologia di informazioni da fornire ai consumatori;
- l'omogeneizzazione dei differenti sistemi nazionali di approvazione dei materiali a contatto con le acque destinate al consumo umano.

L'Agenzia Europea per l'Ambiente (EEA) ha recentemente pubblicato la mappa, per bacino idrogeologico, dei corsi d'acqua che non raggiungono una qualità "buona" (**Figura 1.3**).^[8]

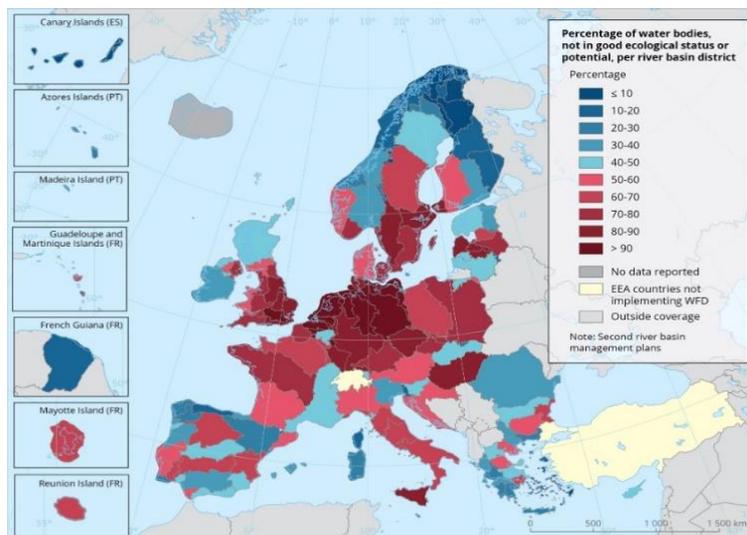


Figura 1.3: Stato ecologico dei bacini idrici superficiali UE

La qualità delle acque superficiali è valutata attraverso il monitoraggio di tratti distinti e significativi di fiume o lago (definiti corpi idrici) sulla base di quanto stabilito dalla Direttiva. La qualità dei corpi idrici è definita mediante due indicatori: lo "stato ecologico", che esprime la qualità dell'ecosistema monitorando alcune comunità biologiche che lo popolano oltre alle caratteristiche fisico-chimiche delle acque; lo "stato chimico", determinato sulla base della concentrazione di sostanze chimiche inquinanti individuate dalla normativa.

Lo stato ecologico può essere valutato in cinque classi (elevato, buono, sufficiente, scarso, cattivo, **Figura 1.4 a**), mentre lo stato chimico in due classi, buono e non buono (**Figura 1.4 b**). [8]

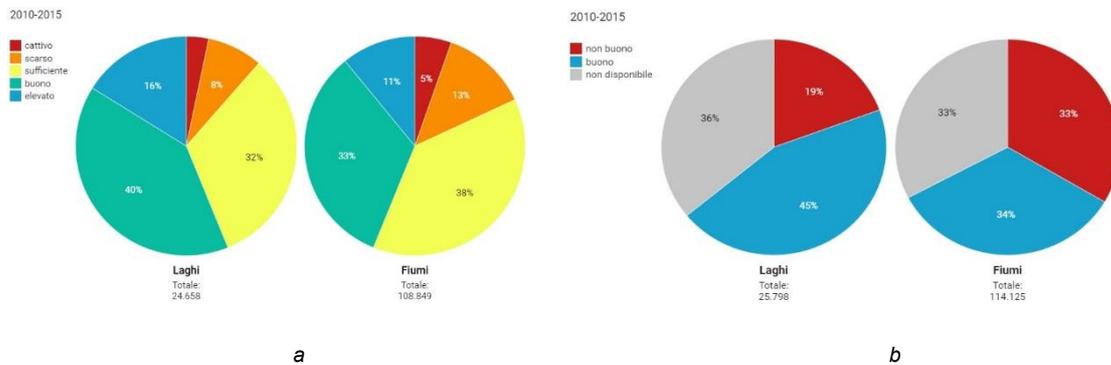


Figura 1.4: a) Stato ecologico delle acque superficiali in Europa 2010-2015
b) Stato chimico delle acque superficiali in Europa 2010-2015

1.2 Il laboratorio

Il laboratorio AGROLAB ITALIA presso il quale ho svolto il tirocinio esterno di Laurea Magistrale è situato ad Altavilla Vicentina e fa parte di AGROLAB GROUP (**Figura 1.5**), un gruppo di laboratori che opera in tutta Europa, sin dal 1986 con sede principale a Bruckberg in Bassa Baviera.^[9] 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.



Figura 1.5: 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 "CROMATOGRAFIA AMBIENTALE". Esso è coinvolto nella determinazione di composti organici volatili (VOC) e semivolatili (SVOC) tramite gas cromatografia (GC) e cromatografia liquida (LC).

2 Direttiva Europea 2020/2184

Come anticipato nel Capitolo 1, il 16 novembre 2020 l'Europarlamento ha approvato la Direttiva Europea 2020/2184 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano.

Gli obiettivi della direttiva sono la protezione della salute umana dagli effetti negativi derivanti dalla contaminazione delle acque destinate al consumo umano, garantendone la salubrità e la pulizia, nonché il miglioramento dell'accesso ad esse.

La Direttiva 2020/2184 stabilisce nuovi requisiti minimi di qualità dell'acqua potabile in tutta l'Unione Europea. Sostituisce la precedente 98/83/CE e introduce alcuni importanti cambiamenti per migliorare la protezione della salute umana. Essa fissa valori limite per nuove sostanze tra cui: il bisfenolo A e acidi aloacetici (di cui l'argomento di Tesi), oltre a molte altre sostanze chimiche inquinanti.

Si applica a tutte le reti di distribuzione dell'acqua potabile e mira a garantire che questa sia sicura e di alta qualità in tutta l'Unione Europea.^[11]

In Italia è entrata in vigore, il 21 marzo 2023, recepita con il Dlgs n.18 del 23 febbraio 2023. Tale norma introduce un approccio olistico alla sicurezza dell'acqua. Prevede nuovi modelli di analisi e di gestione dei rischi di contaminazione estesi dal ciclo naturale dell'acqua al ciclo idrico integrato. Inoltre, migliora la raccolta dei dati sull'inquinamento, il consumo e la qualità delle acque. Il testo della direttiva stabilisce i requisiti minimi che le acque potabili devono rispettare e le attività di monitoraggio che devono essere effettuate dai gestori idropotabili, dalle autorità ambientali e sanitarie; definisce le sanzioni per il mancato rispetto dei parametri normativi, nonché i requisiti minimi per i reagenti chimici e i materiali filtranti attivi e passivi da impiegare nel trattamento delle acque. ^[12]

Lo schema del decreto legislativo in esame è stato adottato in attuazione della Direttiva UE 2020/2184 e della delega contenuta nella legge n. 127/2022 (Delega al governo per il recepimento delle direttive europee).

Tale decreto è finalizzato a:

- rivedere e introdurre norme intese a proteggere la salute umana dagli effetti negativi derivanti dalla contaminazione delle acque destinate al consumo umano.
- stabilire i requisiti di igiene per materiali che entrano in contatto con le acque potabili nonché per i reagenti chimici e i materiali filtranti attivi o passivi da impiegare nel loro trattamento.
- introdurre un approccio di valutazione e gestione del rischio che sia più efficace ai fini della prevenzione sanitaria, della protezione dell'ambiente e del controllo delle acque destinate al consumo umano, anche sotto il profilo dei costi e dell'allocazione delle risorse istituzionali.
- garantire un accesso equo per tutti all'acqua potabile sicura.
- assicurare la comunicazione tra le autorità competenti e i fornitori di acqua e fornire una informazione adeguata e aggiornata al pubblico sulla qualità delle acque.

Il Provvedimento si compone di 26 articoli; sono inoltre acclusi 9 allegati recanti i requisiti igienico-sanitari, ambientali, tecnici e dei sistemi gestionali che devono essere soddisfatti. ^[13]

Tra le sostanze chimiche introdotte dalla nuova direttiva vi sono (come anticipato nel capitolo 2) cinque acidi aloacetici (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA, DBAA) per la somma dei quali viene imposto un limite di legge di 60 µg/L. Tale parametro è misurato esclusivamente se per la disinfezione di acque destinate al consumo umano si utilizzano metodi di disinfezione suscettibili di generare acidi aloacetici. Vi è inoltre il BPA per il quale viene imposto un limite di legge di 2,5 µg/L. ^[14]

3 Inquinanti dell'acqua

Il presente elaborato di Tesi è incentrato sullo sviluppo di metodi per la determinazione di inquinanti emergenti in matrice acquosa. Le matrici acquose possono essere di differenti tipi (di falda, scarico o processo) con possibili differenti trattamenti del campione. Per gli analiti trattati (HAAS, BPA e 17- β -Estradiolo) si fa riferimento ad acque destinate al consumo umano in risposta alla normativa entrata in vigore.

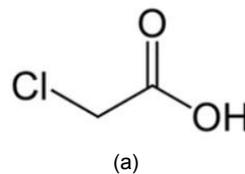
3.1 Acidi aloacetici

Gli acidi aloacetici (HAAS) sono acidi organici derivati dall'alogenazione dell'acido acetico. Si ottengono quindi per sostituzione degli idrogeni del gruppo metilico con uno o più alogeni, generalmente cloro e bromo.

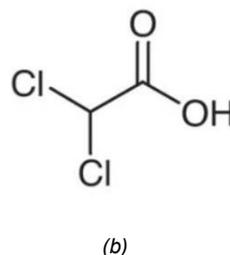
3.1.1 Struttura e proprietà

I sei HAAS tratti nel presente elaborato di Tesi sono:

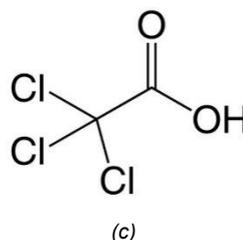
Acido monocloroacetico (MCAA):



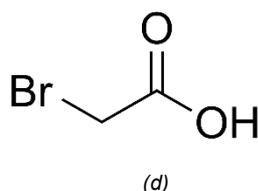
Acido dicloroacetico (DCAA):



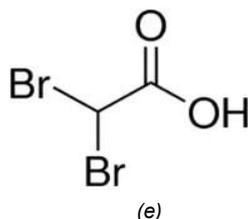
Acido tricloroacetico (TCAA):



Acido monobromoacetico (MBAA):



Acido dibromoacetico (DBAA):



Acido bromocloroacetico (BCAA):

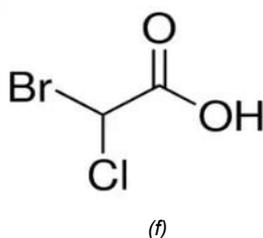


Figura 3.1: Struttura chimica dei 6 HAAS trattati, a)MCAA; b)DCAA; c)TCAA; d)MBAA; e)DBAA; f)BCAA.

Questi composti presentano una maggiore acidità (ad esempio, $pK_{aMCAA}=2,8$) rispetto all'acido acetico ($pK_a=4,8$) dovuta alla presenza di uno o più alogeni sul gruppo metilico. Questi, infatti, essendo legati al carbonio in α al gruppo carbossilico ed essendo atomi che presentano elevata elettronegatività hanno un effetto fortemente elettronnattrattore che stabilizza lo ione aloacetato.

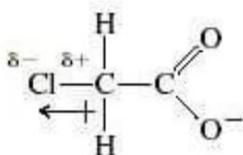


Figura 3.2: Rappresentazione della densità elettronica sullo ione cloroacetato

Tale effetto elettronnattrattore degli alogeni porta alla formazione di una parziale carica positiva (δ^+) sul carbonio a cui sono legati che a sua volta induce una parziale carica positiva sul carbonio carbonilico. Questo effetto induttivo stabilizza lo ione carbossilato degli acidi aloacetici stabilizzando la carica negativa presente

sull'ossigeno. Questo risulta in una maggiore acidità del protone del gruppo carbossilico.^[15]

Essendo composti polari gli acidi aloacetici presentano un'elevata solubilità in acqua (ad esempio, 85,8 g/100 mL a 25 °C per l'MCAA).

3.1.2 Origine ed usi

La prima sintesi di un acido aloacetico, precisamente l'acido monocloroacetico (MCAA) fu realizzata da Reinhold Hoffmann nel 1857, il quale lo ottenne mettendo a riflusso acido acetico glaciale in presenza di cloro e luce. Sempre nel 1857, il chimico francese Charles-Adolphe Wurtz lo ottenne mediante reazione del cloroacetil cloruro (ClCHCOCl) con acqua.^[16]

Industrialmente se ne producono circa 420'000 tonnellate all'anno. Il processo di produzione più utilizzato è quello che prevede la reazione tra l'alogeno (Cl₂ o Br₂) con l'acido acetico utilizzando anidride acetica come catalizzatore. In questo modo si ottengono i derivati dell'acido acetico mono-, di- e tri-alogenato che andranno poi separati per cristallizzazione.

Gli acidi aloacetici hanno svariati campi di applicazione, specialmente l'MCAA perché è uno degli intermedi più importanti nell'industria chimica. L'MCAA è utilizzato in numerosi processi di sintesi organica a motivo della sua elevata reattività. Questi includono la produzione di fitosanitari, fertilizzanti, materie plastiche, detergenti, vernici e lacche, cosmetici e prodotti per l'igiene personale. L'MCAA è presente anche in vari processi nell'industria della carta, farmaceutica e alimentare.

L'uso principale dell'MCAA (fino al 30% della produzione mondiale) è la produzione di carbossimetilcellulosa. Questo derivato della cellulosa viene utilizzato nella produzione di adesivi per carta da parati, detergenti, saponi e come addensante per vernici in emulsione. Nella produzione della ceramica agisce come addensante, plastificante e legante, migliorando anche la levigatezza dello smalto. Nell'industria alimentare la carbossimetilcellulosa, indicata dal simbolo E466, viene utilizzata come addensante, emulsionante e stabilizzante.

Un altro settore che utilizza l'MCAA è l'industria dei prodotti agrochimici. Esso agisce come intermedio nella produzione dei principali costituenti dei prodotti fitosanitari:

- acido 2,4-D (acido 2,4-diclorofenossiacetico),
- esteri dell'acido tiofosforico (ad esempio Dimetoato),
- cloruro di cloroacetile (CAC),
- tricloroacetil cloruro (TCAC),
- acido 2,4,5-triclorofenossiacetico (2,4,5-T),
- acido 2-metil-4-fenossiacetico (MCPA),
- fosfonati (ad esempio il glifosato, ingrediente principale del popolare erbicida Roundup).

L'MCAA trova impiego anche nell'industria cosmetica e dell'igiene personale poiché viene utilizzato nella produzione di betaine, cioè tensioattivi anfoteri con proprietà schiumogene, utilizzati negli shampoo per capelli. Anche l'acido tioglicolico (TGA), che fa parte delle formulazioni permanenti per lo styling dei capelli, viene prodotto utilizzando MCAA.

Un'altra delle applicazioni è la produzione di prodotti farmaceutici, tra cui ibuprofene, diclofenac sale sodico, caffeina sintetica, vitamina B6, glicina e malonati. Inoltre, il cloroacetil cloruro, un derivato dell'MCAA, è un precursore dell'adrenalina.

Nell'industria chimica, questo composto è un intermedio nella sintesi dei coloranti indaco e nella lavorazione del PVC (polivinil cloruro), utilizzato come stabilizzante. Con l'uso dell'MCAA vengono prodotte anche molte altre sostanze chimiche: cumarina, acido malonico, acido cianoacetico e EDTA. ^[17]

3.1.3 Tossicità

La tossicità degli HAAS è dovuta al loro facile assorbimento da parte del nostro organismo, per ingestione o attraverso la pelle, e non vaporizzano all'aria a temperatura ambiente. Pertanto, gli HAAS rappresentano potenziali rischi per la salute derivanti principalmente dall'acqua utilizzata per bere e cucinare. Gli HAAS vengono eliminati completamente dall'organismo da un giorno a due settimane dopo l'ingestione, a seconda dell'acido specifico.

Per quanto riguarda gli effetti sulla salute umana si distinguono effetti a breve e lungo termine:

- *Breve termine*: non si registrano effetti dannosi nel breve termine alle concentrazioni generalmente presenti nelle acque destinate al consumo umano. Tuttavia, se concentrati possono avere effetti irritanti e corrosivi per pelle e occhi.
- *Lungo termine*: il DCAA è stato utilizzato per molti anni nel trattamento di alcuni disturbi metabolici a dosi circa 10.000 volte superiori a quelle a cui si sarebbe esposti nell'acqua potabile. Alcuni effetti osservati nei pazienti sono stati sonnolenza, cambiamenti del metabolismo come diminuzione del glucosio e del colesterolo ed effetti tossici lievi sul sistema nervoso (formicolio alle dita delle mani e dei piedi), che si sono attenuati dopo la fine del trattamento. In studi condotti sugli animali, somministrando alte concentrazioni di HAAS sono stati identificati effetti tossici nel fegato, nei testicoli, nel pancreas, nel cervello e nel sistema nervoso.

L'Environmental Protection Agency (EPA) degli Stati Uniti considera il DCAA e il TCAA potenziali cancerogeni per l'uomo. Negli studi sugli animali si è notato un aumento dell'incidenza del cancro al fegato. In alcuni studi sull'uomo l'esposizione agli HAAS ha aumentato l'incidenza del cancro alla vescica. Sulla base dei dati sugli animali, all'attuale livello normativo degli HAAS (60 µg/L sulla somma dei 5 HAAS), si stima che il rischio di cancro aumenti di circa 1 su 60.000 per ogni 10 anni di esposizione.

Inoltre, negli studi sugli animali, l'esposizione ad elevate concentrazioni ha messo in evidenza alcuni effetti sullo sviluppo, tra cui malformazioni cardiache, renali e tassi di crescita più bassi nei neonati. Studi recenti continuano a trovare associazioni tra l'aumento dell'esposizione agli HAAS e i deficit di crescita nei neonati.^[18]

3.1.4 Immissione

L'immissione degli acidi aloacetici nell'ambiente è dovuta principalmente al processo di disinfezione delle acque. Nel XIX secolo uno dei più importanti progressi nella tutela della salute pubblica fu l'introduzione della disinfezione delle acque potabili. Questo processo ha aiutato a ridurre e prevenire l'incidenza di malattie dovute al consumo di acqua contaminata come ad esempio colera, tifo, dissenteria, e diarrea. Esistono diversi metodi di disinfezione delle acque, ma la clorurazione è la più usata grazie ai bassi costi e alla sua grande efficacia. Tuttavia, il cloro può reagire con eventuali composti (sia organici che inorganici) presenti nell'acqua formando una serie di composti chiamati "Disinfection By-Products" (DBPs). Appartengono a questa classe anche gli HAAS insieme a molti altri composti come, ad esempio, trialometani (THM), bromati e clorati).^[19]

I fattori che influenzano la formazione dei sottoprodotti della disinfezione sono:

- il tipo di disinfettante;
- la dose di disinfettante;
- il residuo di disinfezione;

In **Tabella 3.1** vengono riportati i sottoprodotti di disinfezione ottenuti in base al disinfettante utilizzato.

Tabella 3.1: Sottoprodotti di disinfezione delle acque ottenuti dai vari disinfettanti più comunemente utilizzati.

Disinfettante	Sottoprodotti di disinfezione Organoalogenati	Sottoprodotti di disinfezione inorganici	Sottoprodotti di disinfezione non-alogenati
Cloro (Cl ₂) / acido ipocloroso(HOCl)	trialometani, acidi acetici alogenati, aloacetonitrili, cloroidrato, cloropicrina, clorofenoli, N-cloroammine, alofuranoni, bromoidrine	clorati (soprattutto per applicazione di ipoclorito)	aldeidi, acidi alcanici, benzene, acidi carbossilici
Diossido di cloro (ClO ₂)	-	clorito, clorato	non noto
Cloroammine (NH ₃ Cl etc.)	aloacetonitrili, ciano clorina, cloroammine organiche, cloramino acidi cloroidrati, alochetoni	nitrito, nitrate, clorato, idrazina	aldeidi, chetoni
ozono (O ₃)	bromofornio, monobromina acido acetico, dibromina acido acetico, dibromina acetone, ciano bromina	clorato, iodato, bromato, perossido di idrogeno, acido ipobromoso, epossidi, ozonati	aldeidi, chetoni, chetoacidi, acidi carbossilici

Vi sono inoltre altri fattori che influenzano la formazione dei DBPs:

- il tempo di reazione: quando è breve, si formano maggiori concentrazioni di THM e HAAS;
- la temperatura: all'aumentare della temperatura si ha un aumento della velocità delle reazioni, per cui la disinfezione richiede più cloro con conseguente maggiore formazione di sottoprodotti alogenici;
- il pH: a valori più elevati si formano più THM, mentre quando il pH è più basso si formano più facilmente gli HAAS;
- i costituenti dell'acqua;
- la concentrazione e le proprietà della materia organica normalmente presente nell'acqua; ^[20]

3.2 Interferenti endocrini

Gli interferenti endocrini (IE) sono un gruppo di sostanze chimiche, sia naturali che sintetiche, presenti nell'ambiente e sospettate di alterare la funzione del sistema endocrino e conseguentemente di causare effetti avversi sugli organismi.

In occasione dello *“European workshop in the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife”*, tenutosi a Weybridge in Inghilterra nel 1996,^[21] è stata concordata dalla comunità scientifica internazionale, la seguente definizione: “Una sostanza che altera il sistema endocrino è una sostanza o una miscela esogena che agisce sulle funzioni del sistema endocrino, provocando di conseguenza effetti negativi per la salute di un organismo intatto, della sua progenie o delle (sotto)popolazioni”. Mentre, La Environmental Protection Agency degli Stati Uniti (EPA) ha adottato la seguente definizione: “Gli IE sono composti chimici che interferiscono con le funzioni del sistema endocrino”.

Uno studio del 2003 sulla letteratura scientifica relativa ad alcuni acquedotti europei,^[22] promosso dalla CE, ha classificato gli IE nelle seguenti classi: estrogeni naturali e sintetici, alchilfenoli e alchilfenoli etossilati, acidi alchilfenossiacetici, bisfenolo A, composti organo stannici e pesticidi.

I due interferenti endocrini presi in esame in questo elaborato di tesi sono:

- bisfenolo A;
- 17- β -estradiolo;

3.2.1 Struttura e proprietà

Bisfenolo A

Il BPA è un composto organico di sintesi che presenta due gruppi fenolici geminali (figura 3.3).

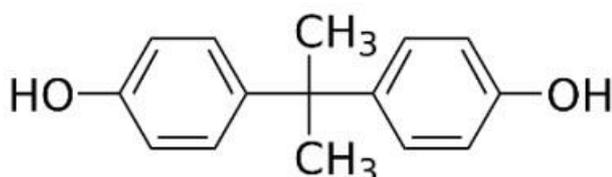


Figura 3.3: Struttura chimica del 2,2-bis(4-idrossifenil) propano (bisfenolo A).

Viene preparato tramite la condensazione dell'acetone (da cui il suffisso A nel nome) con due equivalenti di fenolo. La reazione è catalizzata da un acido, come l'acido cloridrico o una resina solfonata di polistirene. Solitamente, si usa un largo eccesso di fenolo per la piena condensazione.^[23]

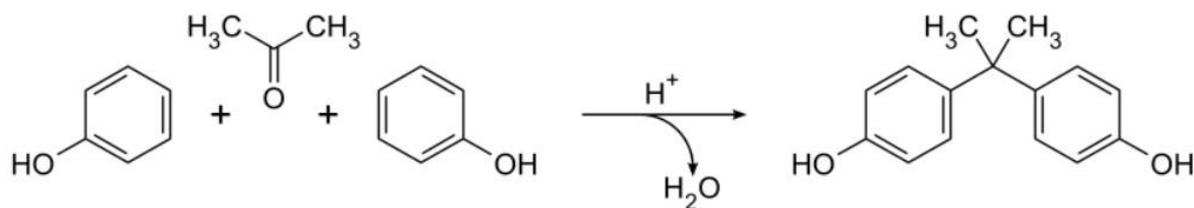


Figura 3.4: Reazione di sintesi del bisfenolo A.

Il BPA è solido a temperatura ambiente insolubile in acqua, ma solubile in molti solventi organici (ad esempio metanolo).

Il BPA è noto per la sua reattività chimica, in particolare come bisfenolo A-glicidilmetacrilato (Bis-GMA), che è un componente chiave nelle resine epossidiche utilizzate in odontoiatria e nell'industria delle materie plastiche. Tuttavia, il BPA è anche noto per la sua capacità di migrare dalla plastica in cui è contenuto in vari prodotti di uso comune, come bottiglie di plastica, contenitori per alimenti e rivestimenti interni di lattine. Questa possibilità ha suscitato preoccupazioni sulla sicurezza e potenziali effetti sulla salute umana.

17- β -estradiolo

Il 17- β -estradiolo (E2) (**figura 3.5**) è un ormone steroideo. Gli ormoni steroidei sono molecole costituite da tre anelli benzenici uniti ad un ciclopentano (ciclopentanoperidrofenantrene). Contando anche i vari sostituenti si trovano strutture a 18 atomi di carbonio (estrogeni), a 19 (androgeni) o 21 (progestinici). Queste sostanze sono di natura lipidica (anche il colesterolo è uno steroide) e sono veicolate nel sangue legate a proteine.

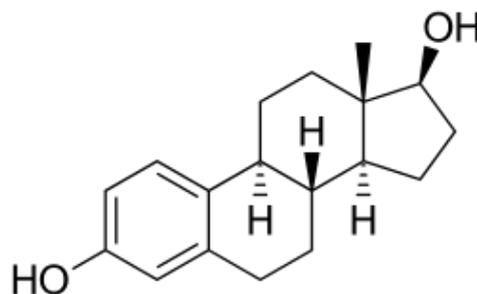


Figura 3.5: Struttura chimica 17- β -estradiolo.

Il 17- β -estradiolo (E2) è l'ormone femminile per eccellenza ed il principale degli estrogeni, gruppo di sostanze che comprende anche l'estrone e l'estriolo. La sintesi dell'E2 avviene in massima parte nell'ovaio da parte delle cellule della granulosa del follicolo ed anche, successivamente, da parte del corpo luteo post ovulatorio. Lo stimolo principale alla sintesi e secrezione dell'E2 è costituito dall'FSH con cui l'E2 determina un feed-back positivo a basse dosi e negativo ad alte. Oltre all'E2 di origine ovarica una quota minore viene prodotta dal corticosurrene e nell'uomo dal testicolo. Inoltre, una percentuale non indifferente si ottiene, soprattutto nelle donne in menopausa, dall'aromatizzazione periferica (muscolo e tessuto adiposo) degli androgeni.^[24]

3.2.2 Origine ed usi

Bisfenolo A

La prima sintesi del bisfenolo A è stata proposta dal russo A.P. Dianin nel 1891 (**figura 3.4**).

Il BPA è componente di base per la produzione del polycarbonato, una plastica ampiamente utilizzata nella fabbricazione dei comuni beni di consumo. È inoltre presente, in particolare, nelle scatole di conserva sotto forma di resina epossidica e nelle carte termiche come sviluppatore di colore. La **tabella 3.2** presenta una panoramica dei numerosi impieghi del BPA.

Tabella 3.2: Differenti usi del BPA.

Tipo di impiego	Dove lo si trova
Plastica (polycarbonato etc.)	Alcuni tipi di bottiglie e recipienti per alimenti, biberon, CD, DVD, Stoviglie in plastica riutilizzabili, telefoni, cellulari, bollitori, vari dispositivi medici e giocattoli. Il BPA può essere presente nelle plastiche con il codice di identificazione 3 o 7 o la dicitura PC. Le bottiglie in PET non contengono BPA
Resina epossidica	Rivestimenti interni delle scatole di conserva e delle lattine, schede di circuiti stampati negli apparecchi elettronici
Sviluppatore di calore	Carte termiche (scontrini, biglietti per i mezzi di trasporto, ricevute bancarie, biglietti per parcheggi)
Altro	Additivi nelle plastiche PVC (cavi, pneumatici), stabilizzatore nei liquidi dei freni, componente nelle resine per le cure dentali etc.

17-β-estradiolo

L'E2 regola così tante e così diverse funzioni biologiche che è stato sviluppato come medicinale già da anni. Viene somministrato ed utilizzato per differenti motivi:

- trattare la pubertà ritardata;

- combattere i sintomi tipici della menopausa come secchezza vaginale, bruciore e irritazione, e prevenire l'osteoporosi nelle donne in post-menopausa;
- ripristinare i suoi livelli quando non è sintetizzato naturalmente a causa di insufficienza ovarica;
- sintetizzare alcuni contraccettivi;
- coadiuvare trattamenti di riproduzione assistita;^[25]

3.2.3 Tossicità

Gli interferenti endocrini sono sostanze in grado di interferire con il funzionamento del sistema endocrino ed in particolar modo con l'omeostasi degli ormoni sessuali provocando quindi effetti dannosi sull'organismo. Essi possono agire con una serie di meccanismi atti a promuovere l'attività degli ormoni fisiologici o a ridurla, oppure, possono interferire con la loro sintesi, il metabolismo o il trasporto (l'effetto in ogni caso si concentra nella variazione della concentrazione ematica di questi ormoni). Inoltre, l'esposizione agli interferenti endocrini (IE) è particolarmente critica durante la fase dello sviluppo (feto, neonato), poiché spesso gli effetti sono irreversibili e talvolta possono essere rilevati soltanto a un'età più avanzata.

Il BPA è un IE in grado di legarsi ai recettori estrogenici che riconoscono l'ormone sessuale femminile, pur essendo, approssimativamente, da 10 000 a 100 000 volte meno attivo dell'ormone naturale. A dosi elevate, il BPA è tossico per il fegato e i reni. Trattandosi di un IE, si sospetta inoltre che il BPA influisca sul sistema riproduttivo, nervoso, immunitario e cardiovascolare nonché sul metabolismo (obesità, diabete) ed eserciti un'azione cancerogena. Si è notato come il BPA sia in grado di modificare la struttura della ghiandola mammaria, il che potrebbe in seguito favorire lo sviluppo di tumori al seno.^[26]

Il 17- β -estradiolo non è di per sé tossico per l'uomo, ma i suoi valori devono rientrare in un determinato intervallo che dipende dall'età e soprattutto dal sesso dell'individuo.

Nelle donne un valore elevato di estradiolo può favorire lo sviluppo di disturbi quali:

- Acne;
- Stitichezza;
- riduzione del desiderio sessuale;
- depressione;

Livelli estremamente alti potrebbero aumentare il rischio di tumore all'utero e al seno e di malattie cardiovascolari. Per valori particolarmente alti è inoltre possibile osservare un aumento di peso e lo sviluppo di disturbi mestruali.

Nel caso di livelli alti di E2 negli uomini si osserva un progressivo sviluppo di caratteristiche femminili e la perdita della funzione sessuale e/o del tono muscolare.^[27]

3.2.4 Immissione

Le principali fonti degli estrogeni sono gli esseri umani e gli animali. Gli estrogeni sono naturalmente secreti nelle donne come componenti integranti del ciclo mestruale ed escreti principalmente dalle urine (95%) come composti solfato o glucuronide-coniugati.^[28]

Dal menarca alla menopausa l'estrogeno maggiormente prodotto è il 17- β -estradiolo; livelli compresi tra 2,5 e 3,5 $\mu\text{g}/\text{giorno}$ sono escreti da donne in età fertile e in menopausa, mentre donne in gravidanza ne possono secernere oltre 259 $\mu\text{g}/\text{giorno}$. Dopo la menopausa l'ormone maggiormente prodotto è l'estrone, che possiede un'attività estrogenica inferiore a quella dell'E2.^[29] Gli uomini invece rilasciano dalle urine 1,6 μg al giorno di 17- β -estradiolo.

Le forme coniugate ritornano allo stato libero ad opera di enzimi batterici presenti nell'ambiente; in tal modo i coniugati, aventi debole potere estrogenico, riacquistano la potenza ormonale primitiva.^[30]

Anche negli animali i livelli di ormoni escreti sono più alti nella fase riproduttiva. Basandosi sui dati esistenti e considerando la quantità di escreti prodotti per animale, Lange et al. [31] hanno calcolato nell'anno 2000, negli USA e nell'Unione europea, una produzione di estrogeni di 49 e 33 tonnellate rispettivamente. Numerosi studi hanno messo in evidenza la possibilità che estrogeni naturali e sintetici, contenuti nelle fognature urbane vadano ad inquinare le acque superficiali attraverso gli effluenti grezzi o trattati.^[31]

Le acque superficiali possono essere contaminate non solo dalle acque reflue, ma anche dai percolati delle discariche dei rifiuti solidi e dalle acque di scorrimento di aree agricole o dove sono presenti allevamenti di bestiame. La concentrazione di questi steroidi negli effluenti dipende dall'efficienza di rimozione dei vari processi di trattamento delle acque reflue. Generalmente i livelli di abbattimento sono alti; i carboni attivi possono eliminare fino 77% della concentrazione di estrogeni presenti. Dopo ossidazione con ozono l'attività estrogenica è ridotta del 99% in campioni di letame preventivamente sottoposti a processi di degradazione anaerobica e aerobica.^[32]

Per quanto riguarda il bisfenolo A, questo è usato principalmente per la produzione di plastiche e suoi derivati, presenti in commercio da più di 50 anni. È utilizzato nella sintesi del poliestere, dei polisulfonati, dei chetoni polieteri, come antiossidante in alcuni plastificanti e come inibitore della polimerizzazione del PVC. È un monomero chiave nella produzione delle resine epossidiche e nelle più comuni forme di policarbonato. Il policarbonato, materiale pressoché infrangibile, è usato per un gran numero di prodotti per l'infanzia (ad esempio il biberon), bottiglie, attrezzature sportive, dispositivi medici e odontoiatrici, lenti per gli occhiali, supporti ottici, elettrodomestici, caschi di protezione, otturazioni dentarie e ovunque siano necessarie caratteristiche di durezza e resistenza. Le resine epossidiche che contengono bisfenolo A sono, invece, utilizzate come rivestimento interno nella maggior parte delle lattine per alimenti e bevande. Il bisfenolo A è anche un precursore per ritardanti di fiamma, come tetrabromobisfenolo A, ed era anche usato come fungicida.^[33]

Piccole quantità di bisfenolo A entrano nell'ambiente attraverso gli impianti di trattamento delle acque reflue.^[34]

4 Validazione di un metodo analitico

La validazione di un metodo di prova è quel processo di valutazione delle caratteristiche analitiche del metodo con la conseguente conferma che il metodo stesso presenti delle consistenti capacità in accordo alla richiesta dell'applicazione finale. Questo viene riassunto col definire quanto un metodo analitico sia affidabile nei risultati ottenuti valutando quindi le incertezze associate e la ripetibilità.

Si distinguono due casi:

- i. Utilizzo o adattamento di un metodo normato già esistente da parte del laboratorio. In questo caso il processo prende il nome di verifica secondaria ed è atta a dimostrare la competenza del laboratorio nell'applicazione del metodo confrontando i dati di ripetibilità sperimentale con la riproducibilità fornita dal metodo stesso.
- ii. Sviluppo “da zero” di un metodo all'interno del laboratorio. Qui si procede ad una validazione effettiva e completa definendo a monte i criteri di accettabilità e performance. ^[35]

I parametri di validazione sono:

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

La *selettività* è la capacità di un metodo di determinare in modo univoco l'analita con il livello di accuratezza prefissato in presenza di eventuali altri componenti che possono essere presenti nel campione da analizzare. La selettività è quindi un parametro imprescindibile per un metodo analitico in quanto questo deve poter definire un singolo analita o una classe nella matrice senza interferenze evitando

quindi falsi positivi. ^[36]

LOD (Limit of Detection) e *LOQ* (Limit of Quantification) sono due parametri di fondamentale importanza in un metodo analitico, soprattutto se si vuole quantificare l'analita a basse concentrazioni.

Il *LOD* o MDL (Method Detection Limit) è definito come la più bassa concentrazione dell'analita nel campione che può essere rilevata (non quantificata) col metodo in uso; quindi, quella concentrazione per la quale si ha il 99% di probabilità che la risposta cromatografica non sia imputabile al rumore di fondo. ^[37]

L'MDL viene determinato eseguendo l'analisi di una serie di bianchi del metodo (MB, Method Blank) e sette prove alla minima concentrazione riconoscibile (rapporto segnale rumore = 5). Si determina la deviazione standard delle sette repliche (*SD*) e la si moltiplica per 3,14.

$$LOD = 3,14 \cdot SD$$

Con:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_1^7 (C_j - \bar{C})^2}{N}}$$

Dove:

- C_j = Singola concentrazione rilevata della ripetuta;
- \bar{C} = Media delle concentrazioni rilevate delle ripetute;
- N = Numero di ripetute ($N = 7$);

- 3,14 che corrisponde al coefficiente t per sei gradi di libertà. ^[38]

Il *LOQ* è il livello più basso a cui si possa associare un'incertezza accettabile. Per una serie di misure ripetute di campioni bianchi o di campioni di prova con basse concentrazioni di analita, si calcolano prima s_0 e s'_0 , poi si può determinare il *LOQ* come:

$$LOQ = 3,18 \cdot 3,14 \cong k_Q \cdot SD$$

Dove k_q è un fattore moltiplicativo adimensionale definito dalla IUPAC il cui valore è 10.

A seguito dell'analisi delle sette misure ripetute e quindi del calcolo dell'MDL vi sono due condizioni di accettabilità dello studio degli MDL:

- MDL deve essere inferiore o pari al primo punto curva dal laboratorio identificato in sede di calcolo come RL (Reporting Limit);
- la media dei valori facenti parte lo studio non deve essere superiore a 10 volte l'MDL.

La prima condizione deve essere rispettata in quanto necessariamente l'MDL deve essere minore del valore minimo oltre il quale il dato viene fornito (cioè, l'RL). In caso contrario si rischia di fornire valori di concentrazione maggiori dell'RL, ma minori dell'MDL, il che sarebbe impossibile. Anche la seconda deve essere rispettata affinché i valori di MDL ottenuti siano da considerarsi accettabili.

L'*intervallo di misura* è l'intervallo di concentrazione per il quale il metodo è in grado di fornire dei risultati a cui è associata un'incertezza attendibile. In prima approssimazione tale intervallo corrisponde al range di concentrazione definito dalla retta di taratura. Il limite inferiore risulterà essere definito dal LOQ mentre il limite superiore viene scelto in funzione del progetto e delle caratteristiche del detector; nel caso in cui, in punto di analisi, un campione risultasse avere una concentrazione maggiore del limite superiore si procede con la diluizione del campione.

La *sensibilità* (o *sensibilità analitica*) è definita come la variazione della risposta dello strumento al variare della concentrazione misurata. Rappresenta la pendenza della retta di taratura. Tanto più è ampia la variazione della risposta dello strumento a parità di variazione di concentrazione, tanto più grande sarà la pendenza della retta.

L'*accuratezza* esprime il grado di accordo tra il valore medio di più misurazioni (in corso di validazione del metodo tipicamente sono undici) al valore reale teorico di riferimento.^[35] È espressa come percentuale di recupero (R%).

$$R\% = \frac{C_{sperimentale}}{C_{attesa}} \cdot 100$$

Considerando l'insieme di più analisi ripetute, i recuperi vengono mediati per ogni livello di concentrazione scelto per la validazione utilizzando la relazione:

$$\bar{R}\% = \frac{\sum_1^N R\%}{N}$$

Dove:

- $\bar{R}\%$ = recupero medio percentuale;
- $R\%$ = Recupero singolo percentuale;
- N = Numero di analisi ripetute (generalmente 11);

Naturalmente l'accuratezza è migliore quanto più il valore di recupero percentuale medio si avvicina al 100%. In base alla tipologia di analisi svolta, sono presenti nelle normative gli intervalli all'interno dei quali deve ricadere $\bar{R}\%$.

La *precisione* di un metodo va a definire quanto vicini sono i risultati tra di loro considerando una concentrazione attesa unica. Si definisce quindi il concetto di ripetibilità interna, dove un singolo tecnico servendosi della medesima attrezzatura e strumentazione in un breve intervallo di tempo svolge più volte le fasi di preparazione del campione e di analisi dello stesso. Si determina quindi il Coefficiente di Variazione Percentuale (CV%) come:

$$CV\% = \frac{SD}{\bar{C}_{sper}} \cdot 100$$

Dove:

- CV% = Coefficiente di variazione percentuale (incertezza di ripetibilità);
- SD = Deviazione standard tra i valori di concentrazione ottenuti dalle ripetute;
- \bar{C}_{sper} = media delle misure delle concentrazioni ottenute dalle ripetute;

Il valore del CV% è migliore quanto più è piccolo indica quanto le misure ripetute presentino variazione l'una dall'altra.

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 quindi un'indicazione di quanto è affidabile il metodo nel suo uso quotidiano. Tale parametro viene considerato in fase di sviluppo unicamente per metodi interni.^[39]

5 Scopo della Tesi

Lo scopo del lavoro sperimentale svolto presso Agrolab Italia è stato lo sviluppo di metodi di analisi mediante Cromatografia Liquida ad Alta Prestazione (HPLC) accoppiata ad uno Spettrometro di Massa Triplo Quadrupolo (tecnica ifenata LC/MS) per la determinazione quantitativa in matrice acquosa di:

6 Acidi Aloacetici (HAAS):

- acido monocloroacetico (MCAA);
- acido dicloroacetico (DCAA);
- acido tricloroacetico (TCAA);
- acido monobromoacetico (MBAA);
- acido dibromoacetico (DBAA);
- acido bromocloroacetico (BCAA);

2 Interferenti Endocrini:

- 17- β -estradiolo;
- bisfenolo A (BPA);

Obiettivo molto importante era, inoltre, quello di implementare tali metodi di analisi per iniezione diretta del campione, evitando quindi passaggi di estrazione come, ad esempio, l'estrazione in fase solida (SPE, Solid Phase Extraction). Dispendiosa sia a livello economico, a causa del costo elevato delle cartucce SPE, sia per quanto riguarda il tempo di preparazione del campione. La sfida era dunque duplice: distinguere e quantificare gli analiti in esame alle concentrazioni dettate dai limiti imposti dalla Direttiva Europea 2020/2184 e farlo senza bisogno di concentrare il campione.

Precisamente:

- somma di 5 HAAS (MCAA+DCAA+TCAA+MBAA+DBAA): 60 $\mu\text{g/L}$;
- bisfenolo A: 2,5 $\mu\text{g/L}$; ^[10]

Per quanto riguarda invece il BCAA esso non rientra nella Direttiva 2020/2184, così come il 17- β -estradiolo. Questi, però, sono stati inseriti dalla Commissione UE con una decisione di esecuzione nell'elenco delle sostanze che dovranno essere attentamente monitorate lungo l'intera catena di approvvigionamento idrico.

Per questi due composti, non essendoci limiti di legge, si è deciso di rifarsi ai limiti di legge rispettivamente degli HAAS e del BPA sopra riportati.

6 Sostanze e strumenti

6.1 Sostanze utilizzate

Acqua: VWR Chemicals®, HiPerSolv CHROMANORM for HPLC LC-MS grade-suitable for UPLC/UHPLC instruments,^[41] impiegata per la costituzione della fase mobile A e per la formazione degli standard secondari dei singoli HAAS.

Metanolo (MeOH): VWR Chemicals®, HiPerSolv CHROMANORM for HPLC LC-MS grade-suitable for UPLC/UHPLC instruments (purezza $\geq 99.9\%$),^[42] liquido incolore, impiegato per la costituzione della fase mobile B.

Acetonitrile: Merck KGaA®, Hypergrade for LC-MS LiChrosolv® (purezza $\geq 99,97\%$),^[43] liquido incolore, utilizzato per la costituzione della fase mobile B.

Idrossido d'ammonio: Sigma Aldrich®, ammonium hydroxide solution – 28% NH₃ in H₂O, $\geq 99.99\%$ trace metals basis,^[57] liquido incolore utilizzato per la costituzione della fase A.

Acido formico: VWR Chemicals®, Formic Acid for LC-MS (purezza $\geq 99\%$),^[44] liquido incolore, utilizzato per la costituzione della fase mobile A e per l'acidificazione del campione direttamente in vial.

Acido monocloroacetico (MCAA): Sigma Aldrich®, purezza $\geq 99\%$,^[45] solido bianco cristallino, standard primario utilizzato per la costituzione di uno standard secondario (Soluzione a 1000 ppm) ottenuto per diluizione di 10 mg di MCAA in un matraccio da 10 mL portando a volume con acqua.

Acido dicloroacetico (DCAA): Supelco®, Dichloroacetic acid PESTANAL™, analytical standard, purezza $\geq 98.1\%$,^[46] solido bianco cristallino, standard primario utilizzato per la costituzione di uno standard secondario (soluzione a 1000 ppm) ottenuto per diluizione di 10 mg di DCAA in un matraccio da 10 mL portando a volume con acqua.

Acido tricloroacetico (TCAA): Sigma Aldrich®, Trichloroacetic acid ACS reagent, $\geq 99.0\%$, purezza $\geq 99.1\%$,^[47] solido bianco cristallino, standard primario utilizzato per la costituzione di uno standard secondario (soluzione a 1000 ppm) ottenuto per diluizione di 10 mg di TCAA in un matraccio da 10 mL portando a volume con acqua.

Acido monobromoacetico (MBAA): Sigma Aldrich®, Bromoacetic acid reagent grade 97%, purezza $\geq 96.5\%$,^[48] solido bianco/liquido incolore, standard primario utilizzato per la costituzione di uno standard secondario (soluzione a 1000 ppm) ottenuto per diluizione di 10 mg di MBAA in un matraccio da 10 mL portando a volume con acqua.

Acido dibromoacetico (DBAA): Supelco®, Dichloroacetic acid PESTANAL™, analytical standard, purezza $\geq 95\%$,^[49] liquido incolore, standard primario utilizzato per la costituzione di uno standard secondario (soluzione a 1000 ppm) ottenuto per diluizione di 10 mg di DCAA in un matraccio da 10 mL portando a volume con acqua.

Acido bromocloroacetico (BCAA): Sigma Aldrich®, Bromochloro acetic acid, purezza $\geq 96\%$,^[50] solido/liquido incolore-giallognolo, standard primario utilizzato per la costituzione di uno standard secondario (soluzione a 1000 ppm) ottenuto per diluizione di 10 mg di BCAA in un matraccio da 10 mL portando a volume con acqua.

Bisfenolo A: Supelco®, purezza $\geq 99\%$,^[58] solido bianco, standard primario utilizzato per la costituzione di uno standard secondario (1000 ppm) ottenuto per diluizione di 10 mg di bisfenolo A in un matraccio da 10 mL portando a volume con metanolo.

17- β -estradiolo: Supelco®, purezza $\geq 97\%$,^[59] solido bianco, standard primario utilizzato per la costituzione di uno standard secondario (1000 ppm) ottenuto per diluizione di 10 mg di 17- β -estradiolo in un matraccio da 10 mL portando a volume con metanolo.

6.2 Apparecchiature utilizzate

Vetreteria da laboratorio: becker, matracci, bottiglie in vetro per fasi mobili, vial da 10 mL, pipette Pasteur, cilindri, vial da autocampionatore in vetro.

Micropipette (Sartorius m-Line):

- P1000 per prelevare volumi nell'intervallo 100-1000 μL ;
- P200 per prelevare volumi nell'intervallo 20-200 μL .

Bilancia analitica: Mettler Toledo AG204 (0.1 mg – 210 g).

HPLC-MS/MS: Mediante cromatografia liquida si separano i singoli analiti per l'individuazione tramite spettrometria di massa.

La colonna di separazione è localizzata all'interno di uno scomparto a temperatura controllata. Un estremo della colonna è collegato al sistema di iniezione, mentre l'altro estremo è interfacciato con lo spettrometro di massa. Come spettrometro di massa è stato impiegato un triplo quadrupolo, costituito in sequenza da un quadrupolo, una cella di collisione e un altro quadrupolo. L'introduzione delle ultime due parti rispetto al singolo quadrupolo permette una migliore identificazione degli analiti presenti in virtù di una migliore frammentazione della molecola.

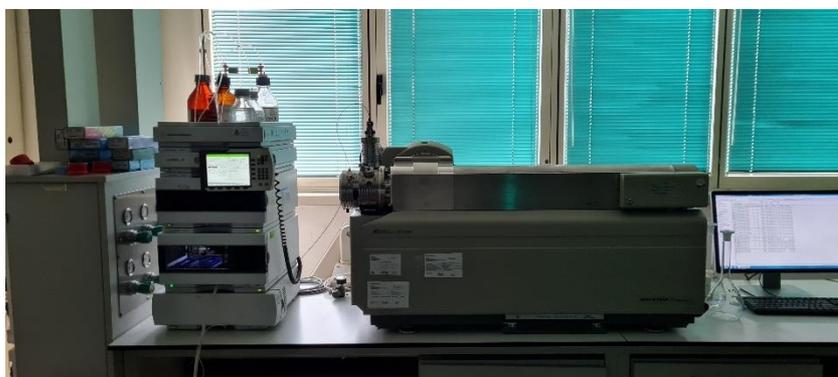


Figura 6.1: Sistema HPLC-MS/MS utilizzato, codice interno aziendale: 3162.

Per lo sviluppo di questo metodo è stato utilizzato un sistema HPLC-MS/MS composto da:

- *autocampionatore*: Agilent 1200 Series Sampler – G1367C;
- *pompa binaria*: Agilent 1200 Series Bin Pump – G1312B;
- *comparto colonna termostata*: Agilent 1200 Series – G1397B;
- *degasatore*: Agilent 1200 Series – G1397B
- *modulo di controllo*: Agilent Series Instant Pilot – G4208A;
- *spettrometro di massa a triplo quadrupolo*: AB Sciex API 4000QTrap;

Colonna cromatografica:

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HPH-C18, 3.0 x 150 mm, 2.7 µm (p/n 693975-502).

7 HAAS

7.1 Metodo sviluppato

Il metodo sviluppato fa riferimento al metodo normato EPA 8321, il quale fornisce le condizioni per la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e le condizioni per la spettrometria di massa termospray (TS) o elettrospray (ESI) per la determinazione degli analiti target.^[40]

L'EPA 8321 non è destinato ad essere un manuale di formazione analitica. Pertanto, le procedure del metodo sono scritte sulla base del presupposto che saranno eseguite da analisti formati almeno sui principi di base dell'analisi chimica e sull'uso della tecnologia in questione.

7.1.1 Procedura sperimentale

Il metodo sviluppato prevede un'iniezione diretta nel sistema HPLC-MS/MS del campione di acqua, previa eventuale filtrazione del campione, in caso esso si presentasse torbido, e aggiunta in vial di un 10% di fase mobile A (H₂O ultra-pura LC-MS con 0.05% di acido formico), per la determinazione e quantificazione dei sei acidi aloacetici menzionati precedentemente.

La procedura sperimentale consiste quindi nell'aggiunta diretta in vial (da 1 mL) di 900 µL del campione e 100 µL di fase mobile A.

Per lo sviluppo del metodo sono state effettuate diverse prove prima di giungere alle condizioni finali. Di seguito viene riportato un confronto tra due cromatogrammi ottenuti, il primo (**figura 7.1**) è stato ottenuto senza l'aggiunta in vial di 10% di fase mobile A, mentre il secondo (**figura 7.2**) è stato ottenuto con tale aggiunta. Entrambi i cromatogrammi sono stati registrati con gli analiti alle seguenti concentrazioni:

- MCAA 400 ppb;
- DCAA, TCAA, MBAA, DBAA, BCAA 200 ppb;

Si può notare una diminuzione significativa dei tempi di ritenzione degli analiti oltre

che un restringimento delle bande dei segnali; questo ha permesso di ridurre la durata della corsa da 25 minuti a 15 minuti.

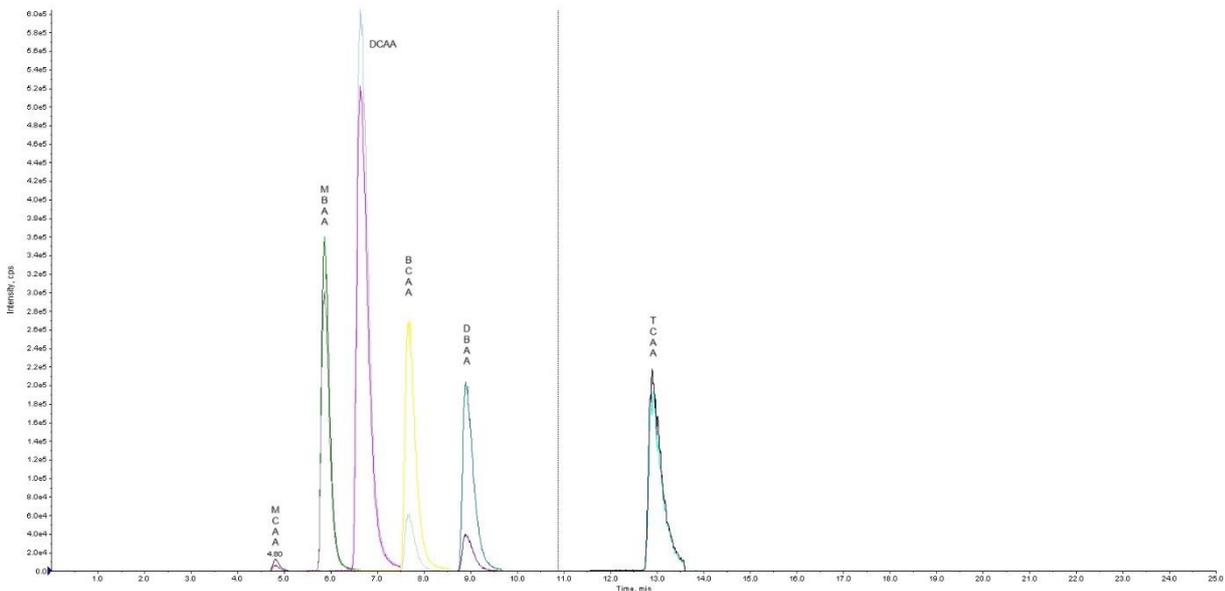


Figura 7.1: Cromatogramma di prova ottenuto senza aggiunta di fase mobile A in vial.

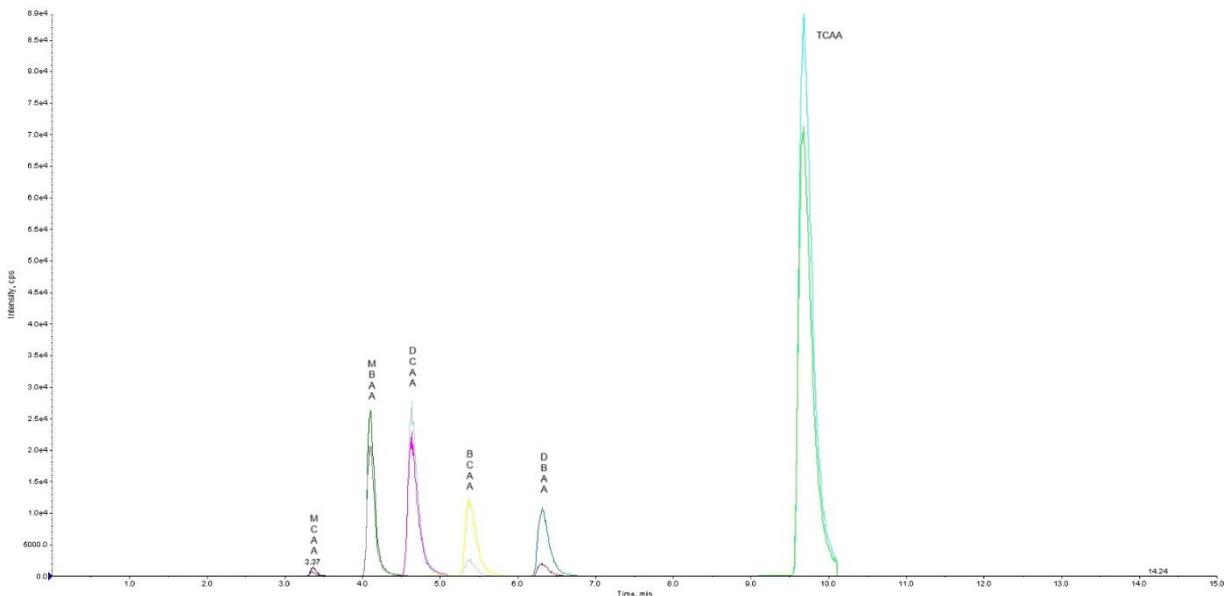


Figura 7.2: Cromatogramma di prova ottenuto con l'aggiunta di fase mobile A in vial.

Fatte queste valutazioni si è quindi proceduto con le prove di validazione a tre livelli di concentrazioni differenti, ciascuna studiata in batch da 11 campioni, numero ottimale per un corretto confronto di ripetibilità fornendo 10 gradi di libertà (vedi capitolo 5).

7.1.2 Analisi strumentale

Il sistema HPLC-MS/MS descritto nel Paragrafo 6.1.2 è stato utilizzato per la determinazione dei 6 HAAS considerati. La **tabella 7.1** mostra i parametri ottimizzati per l'HPLC e l'MS, la **tabella 7.2** mostra il gradiente e infine la **tabella 7.3** mostra i tempi di ritenzione e i parametri di acquisizione MRM (Multiple reaction monitoring) ottimizzati utilizzati per l'identificazione e la quantificazione dei sei acidi aloacetici presi in considerazione (01 = transizione principale, 02 = transizione secondaria).

Tabella 7.1: Parametri HPLC e MS.

HPLC	
Colonna	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HPH-C18, 3.0 x 150 mm, 2.7 μ m (p/n 693975-502).
Temperatura colonna [°C]	40
Volume di iniezione [μ L]	20
Fase Mobile	A: Acqua con 0.05% di acido formico B: Metanolo
Flusso [μ L/min]	350
Tempo corsa [minuti]	15
MS	
Sorgente ionica	Turbo Spray
Potenziale di entrata (EP) [V]	-10
Tensione Spray Ionico [V]	-4500
Temperatura sorgente [°C]	150
Polarità	Negativa

Tabella 7.2: Gradiente fasi mobili.

Gradiente		
Tempo [Min]	A %	B %
0.00	95	5
9.00	5	95
9.10	95	5
15.00	95	5

Tabella 7.3: Tempi di ritenzione e parametri di acquisizione MRM.

MRM						
Composto	Tempo di ritenzione [Min]	Q1 [m/z]	Q3[m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
MCAA 01	3.35	93.0	35.0	-35.0	-13.0	-11.9
MCAA 02	3.35	95.0	37.0	-35.0	-13.0	-11.9
DCAA 01	4.60	127.0	83.0	-35.0	-11.0	-11.9
DCAA 02	4.60	129.0	85.0	-35.0	-13.0	-11.9
TCAA 01	9.80	160.9	116.9	-35.0	-7.0	-6.0
TCAA 02	9.80	163.0	119.0	-35.0	-10.0	-15.0
MBAA 01	4.07	137.0	79.0	-35.0	-11.0	-11.9
MBAA 02	4.07	139.0	81.0	-35.0	-19.0	-11.9
DBAA 01	6.26	215.0	171.0	-35.0	-11.0	-11.9
DBAA 02	6.26	217.0	173.0	-35.0	-37.0	-11.9
BCAA 01	5.34	172.7	128.7	-35.0	-11.0	-11.9
BCAA 02	5.34	172.7	78.7	-35.0	-21.0	-11.9

I campioni reali vengono analizzati in batch, ovvero un quantitativo di campioni, massimo 20, simili tra loro per matrice e processati impiegando la stessa procedura nello stesso momento.

Per ogni batch viene preparato e caricato un controllo di calibrazione strumentale all'inizio e alla fine dell'analisi. Tale prova di controllo è chiamata CCV (Continuing Calibration Verification) e viene effettuato su un punto a metà della curva di calibrazione. In questo caso si è scelto di utilizzare come controllo il punto 4 della curva di calibrazione (CAL_04, vedi **tabella 7.4**).

Per ogni batch, inoltre, si preparano dei controlli preparativi:

- *MB (Method Blank)*: campione composto solo da matrice pulita (Acqua Levissima) sempre con aggiunta di 10% di fase A in vial. Tale controllo serve per verificare la presenza di eventuali contaminanti.
- *LCS (Laboratory Control Sample)*: campione preparato sempre in matrice pulita (acqua Levissima) con aggiunta di analiti a concentrazione nota. Vengono poi seguiti tutti i passaggi previsti dalla procedura sperimentale, che in questo caso consistono nella semplice aggiunta di 10% di fase A in vial. Tale controllo serve per monitorare la performance del laboratorio.
- *LCSD (Laboratory Control Sample Duplicate)*: tale controllo viene effettuato solo se richiesto e altro non è che un duplicato di LCS e serve per ottenere informazioni riguardanti la ripetibilità.

- *MS (Matrix Spike)*: tale controllo consiste nell'aggiunta di una quantità nota di analiti di processo su matrice reale. Viene pertanto utilizzato un campione in analisi. L'aggiunta viene realizzata aggiungendo una quantità di standard tale da ottenere in vial una concentrazione pari a quella del CCV.
- *MSD (Matrix Spike Duplicate)*: analogamente al LCSD questo controllo altro non è che un duplicato di MS.

7.2 Risultati e discussione

In questo paragrafo vengono riportati i risultati relativi alla calibrazione e alla validazione del metodo considerato. È stata costruita una retta di taratura e successivamente è stata eseguita la validazione sperimentale.

7.2.1 Calibrazioni

La retta di calibrazione per questo metodo è stata eseguita preparando sei vial da 1 mL ognuna identificata con un numero progressivo relativo ai sei punti di calibrazione. Le soluzioni di calibrazione sono state preparate in matracci da 1 mL come descritto in **tabella 7.4** partendo da una "soluzione mix madre" contenente gli standard dei sei analiti alle seguenti concentrazioni:

- MCAA: 20 ppm;
- DCAA, TCAA, MBAA, DBAA, BCAA: 10 ppm.

Tabella 7.4: Punti di calibrazione.

Punti di cal.	Concentrazione [ppb] DCAA, TCAA, MBAA, DBAA, BCAA	Concentrazione [ppb] MCAA	Volume [μL] soluzione Acqua 10% Fase A	Volume [μL] Mix Madre	Volume [μL] CAL_03	Volume [μL] CAL_05	Volume [μL] CAL_06
CAL_01	10	20	900	-	100	-	-
CAL_02	50	100	900	-	-	100	-
CAL_03	100	200	900	-	-	-	100
CAL_04	200	400	980	20	-	-	-
CAL_05	500	1000	950	50	-	-	-
CAL_06	1000	2000	900	100	-	-	-

Una volta preparate le vial relative ai sei punti di calibrazione queste sono state poste nell'autocampionatore dell'HPLC e sono state fatte analizzare utilizzando il metodo strumentale descritto nel Paragrafo 7.1.2.

Di seguito vengono riportati i cromatogrammi ottenuti dai differenti livelli di concentrazione (**figure 7.3-7.8**). Da notare che l'MCAA è stato tarato ad una concentrazione doppia rispetto agli altri HAAS considerati. Questa è stata una scelta presa in accordo con il correlatore a fronte del fatto che alla concentrazione di 10 ppb l'MCAA forniva una banda di segnale il cui rapporto segnale/rumore, calcolato con il software aziendale "Chromviewer", risultava minore o uguale a 3, valutato troppo basso per essere considerato un picco. Si è quindi deciso di aumentare la concentrazione del primo punto curva (e quindi proporzionalmente anche degli altri 5) dell'MCAA dato che il limite di legge si riferisce alla somma dei 5 HAAS (MCAA + DCAA + TCAA + MBAA + DBAA) la quale non deve essere superiore di 60 ppb ($\mu\text{g/L}$).

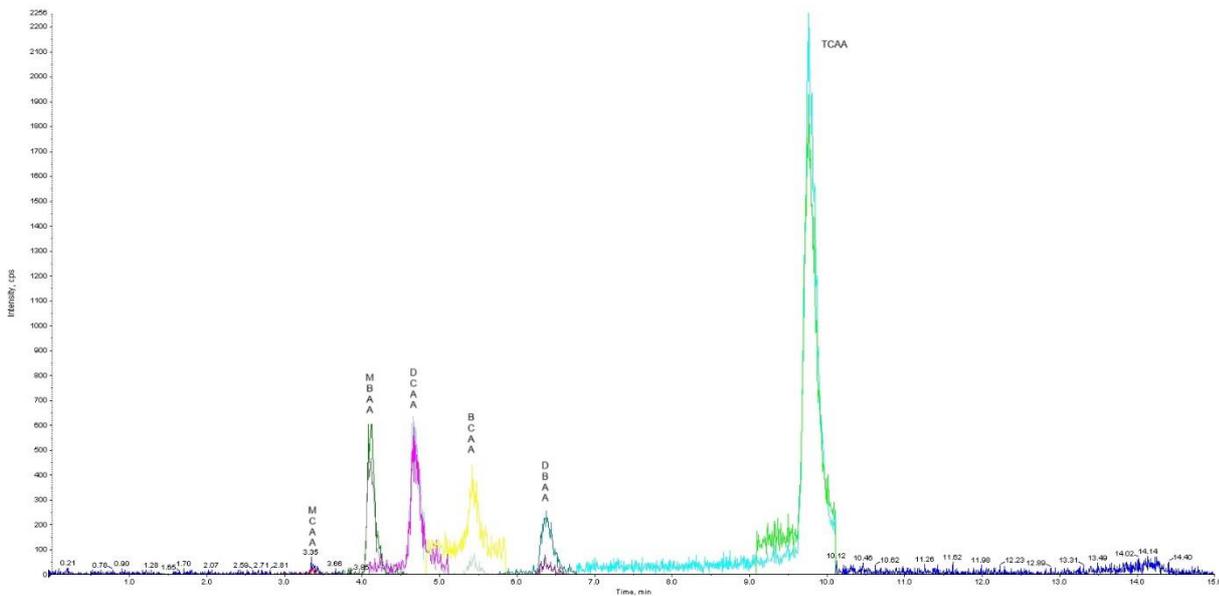


Figura 7.3: Cromatogramma del primo punto di calibrazione 1 (CAL_01).

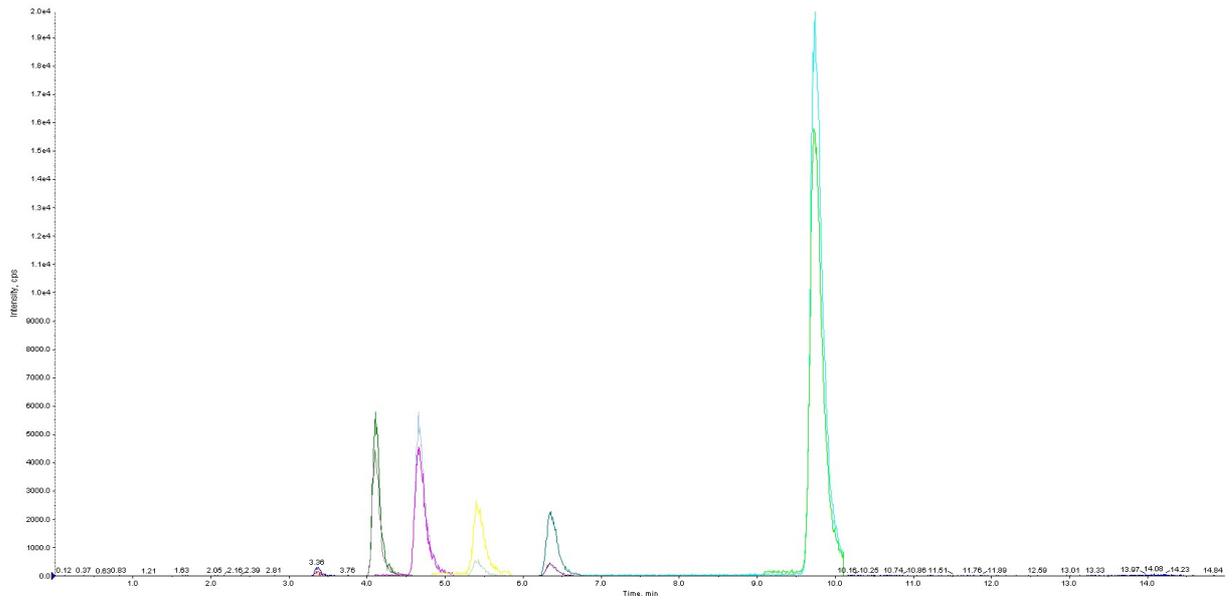


Figura 7.4: Cromatogramma del secondo punto di calibrazione (CAL_02).

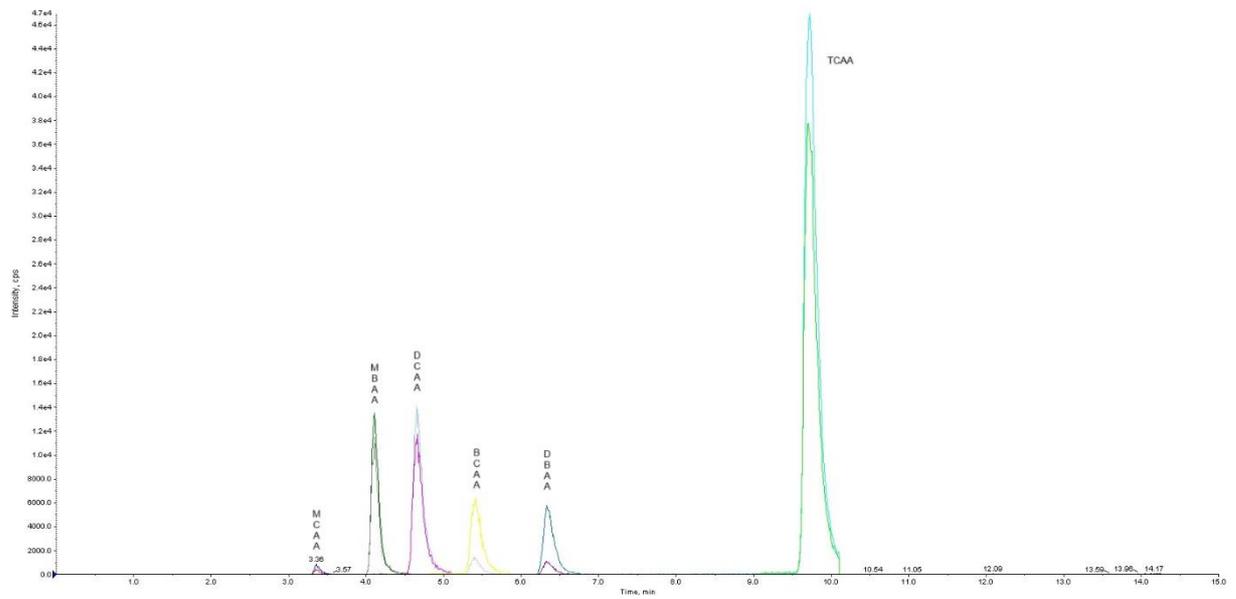


Figura 7.5: Cromatogramma del terzo punto di calibrazione (CAL_03).

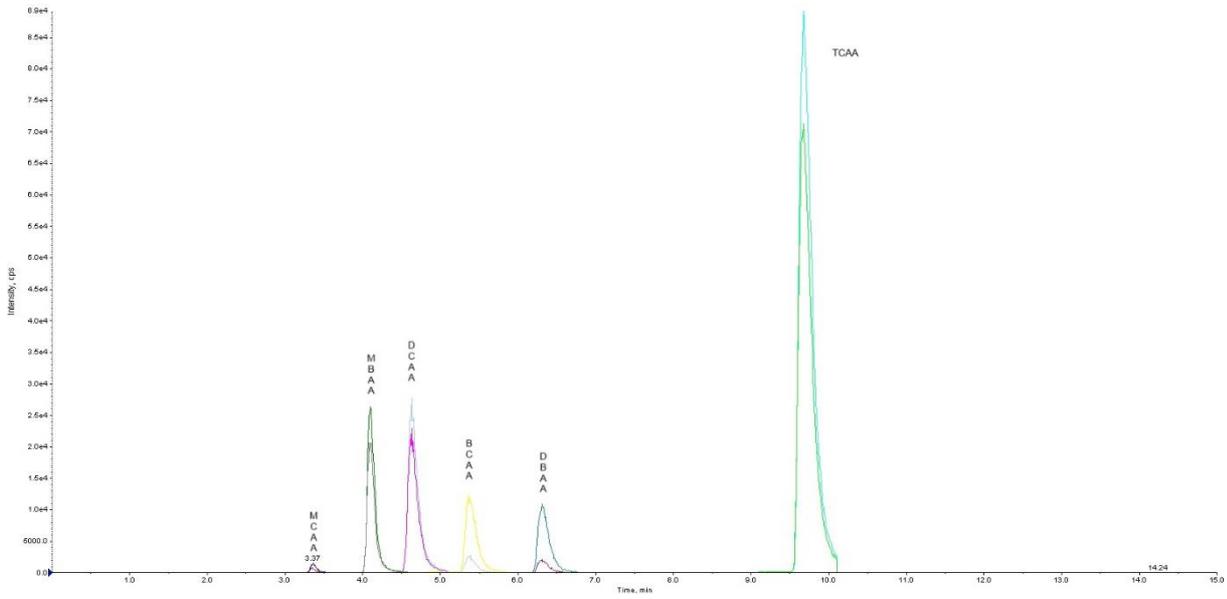


Figura 7.6: Cromatogramma del quarto punto di calibrazione (CAL_04).

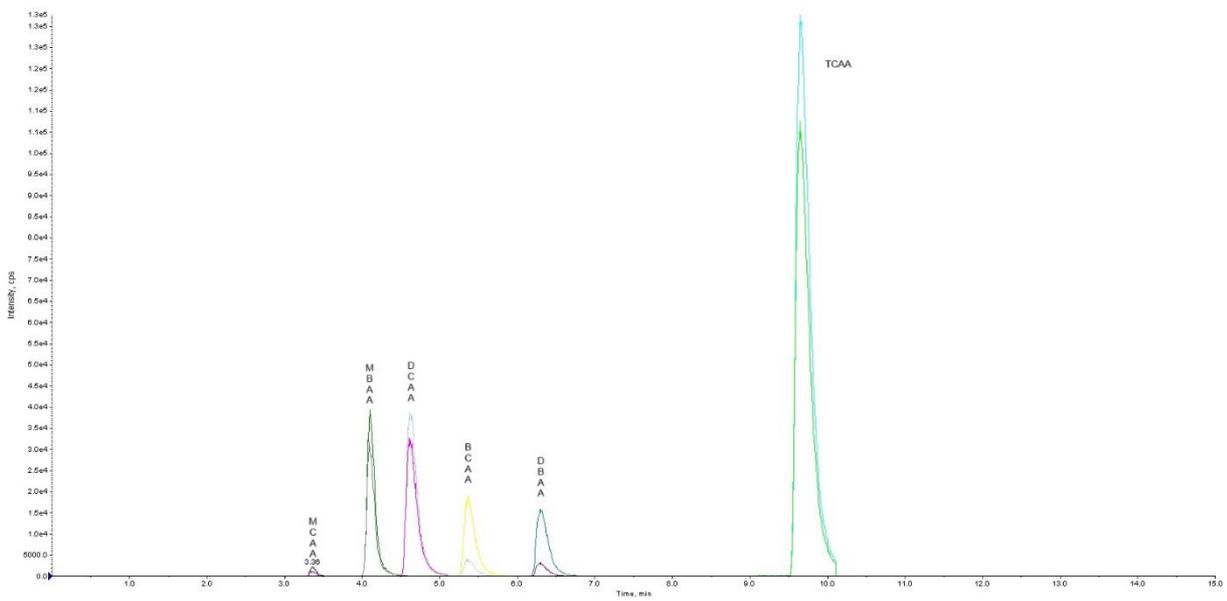


Figura 7.7: Cromatogramma del quinto punto di calibrazione (CAL_05).

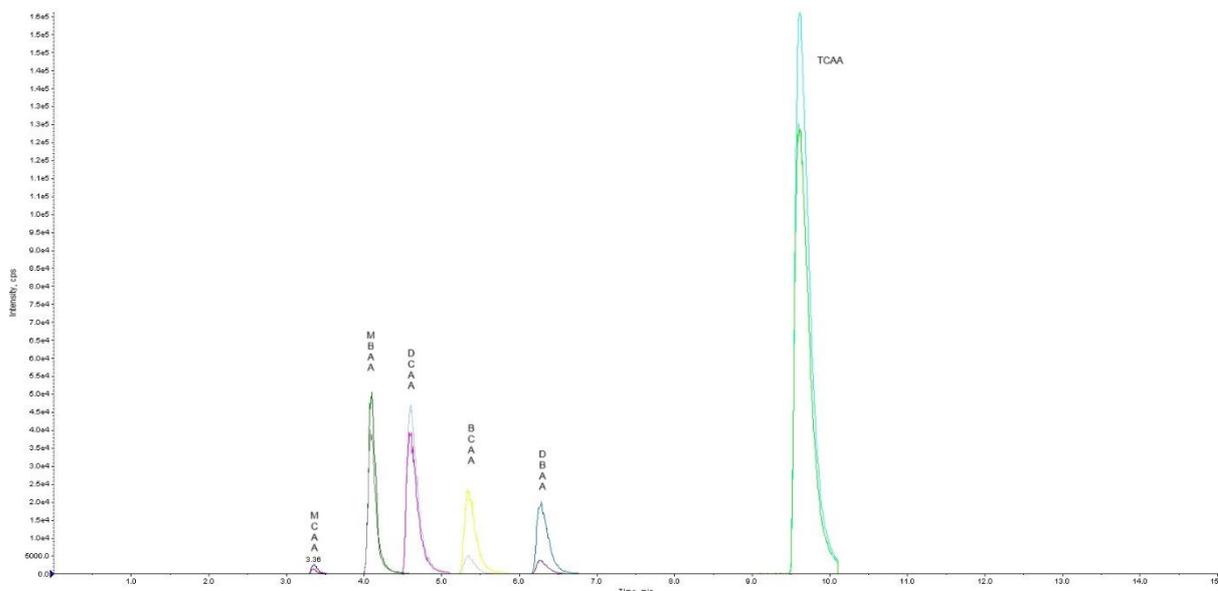


Figura 7.8: Cromatogramma del sesto punto di calibrazione (CAL_06).

Di seguito vengono riportati i risultati delle integrazioni (**tabella 7.5**) e le relative rette di calibrazione per ciascun acido aloacetico preso in esame.

Tabella 7.5: Risultati integrazioni curva di calibrazione.

Punti di Calibrazione	Area					
	MCAA	DCAA	TCAA	MBAA	DBAA	BCAA
CAL_01	171.22	2429.79	8854.23	1710.28	1260.98	1399.60
CAL_02	962.34	11968.84	46280.89	8850.53	5429.04	6019.98
CAL_03	2080.73	24191.34	106658.60	19280.15	11339.95	11677.99
CAL_04	4213.63	48911.46	209306.00	37971.99	25100.05	23398.06
CAL_05	9297.74	118509.30	507931.50	96098.87	57159.68	56784.98
CAL_06	18283.11	238520.30	994966.30	188967.20	115079.00	116617.90

Le curve di calibrazione vengono ottenute ponendo sull'asse delle ascisse la concentrazione (**tabella 7.4**) e sull'asse delle ordinate l'area ottenuta dalle integrazioni dei picchi (**figure 7.9-7.14**). Il fitting è lineare e forzato sull'origine come descritto nel metodo EPA 8321.^[51]

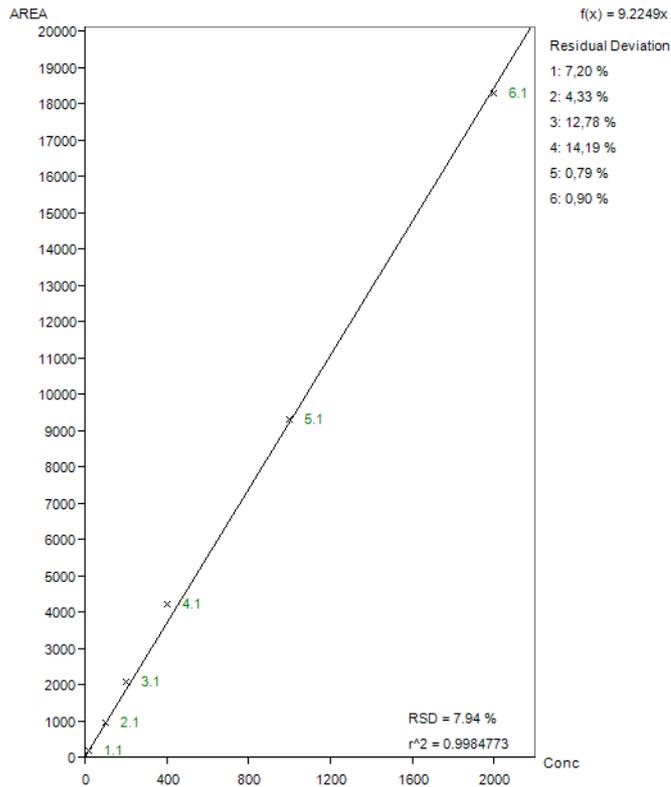


Figura 7.9: Curva di calibrazione MCAA.

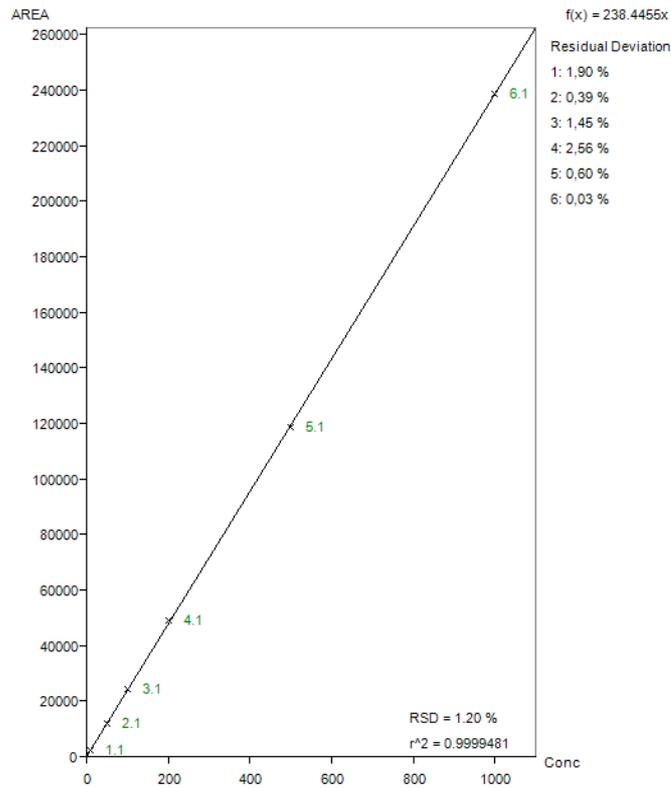


Figura 7.10: Curva di calibrazione DCAA.

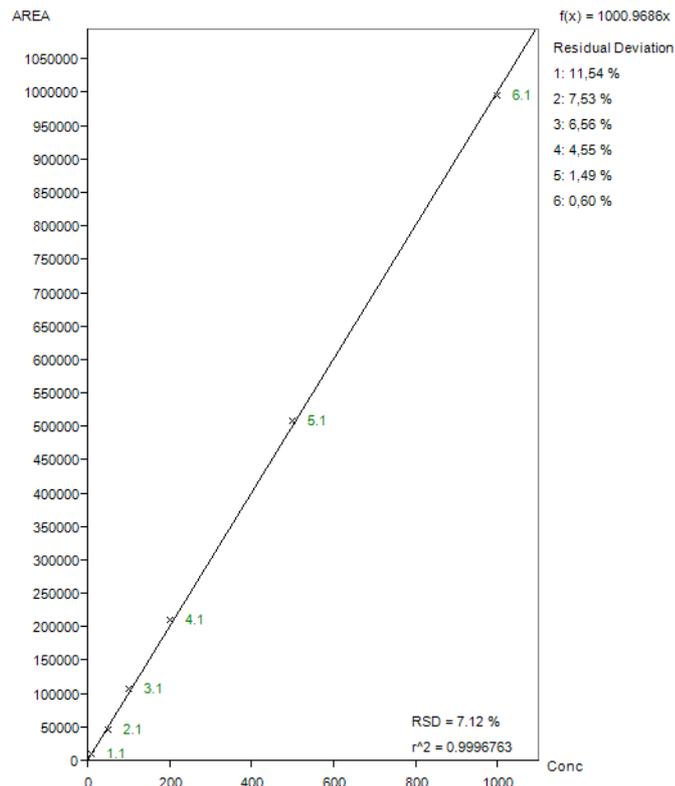


Figura 7.11: Curva di calibrazione TCAA.

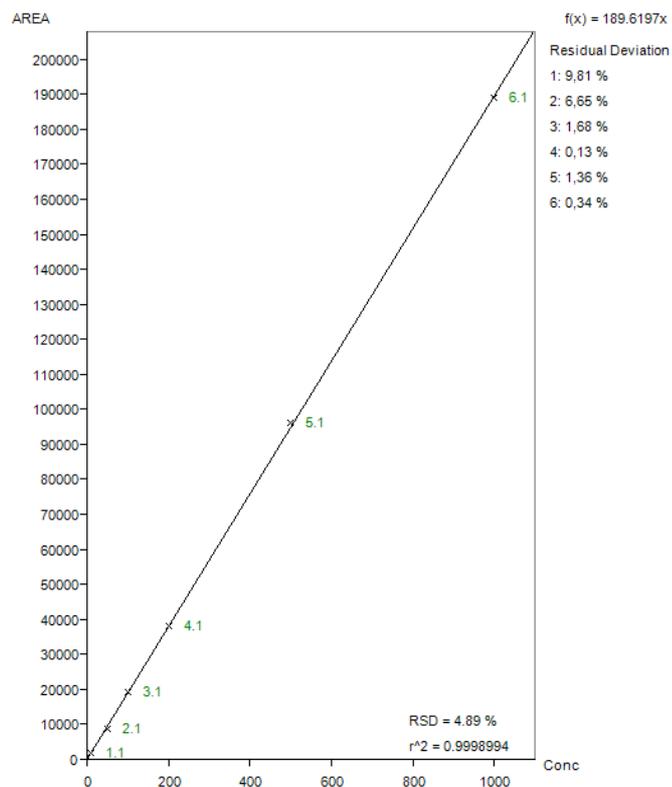


Figura 7.12: Curva di calibrazione MBAA.

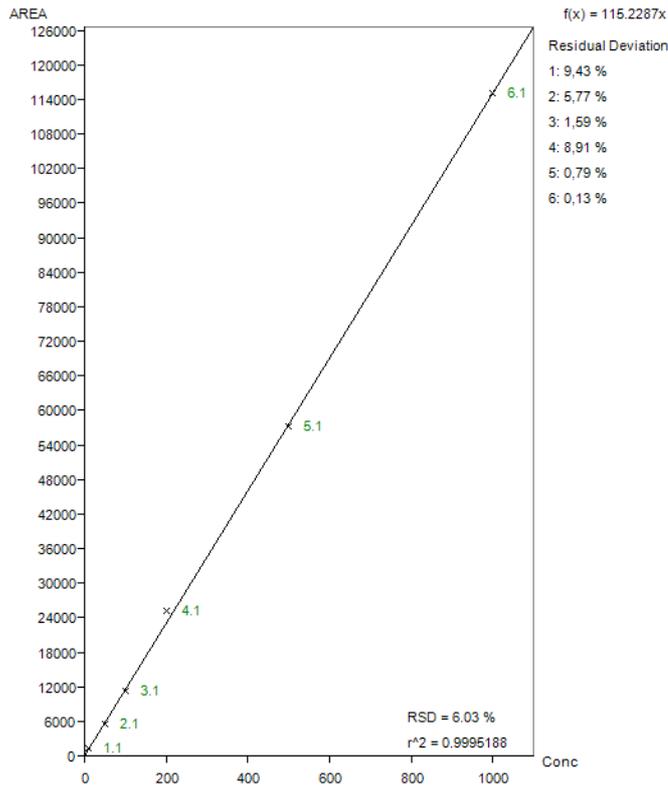


Figura 7.13: Curva di calibrazione DBAA.

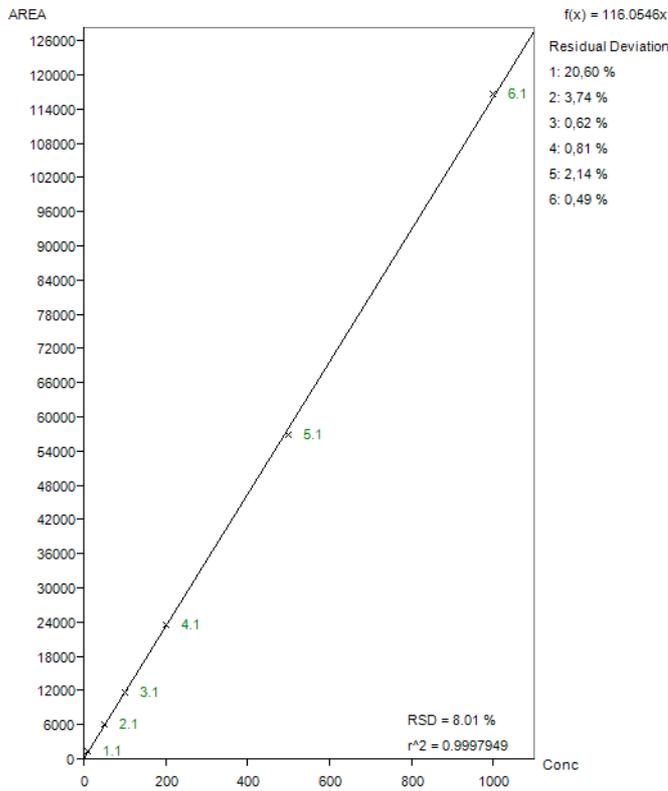


Figura 7.14: Curva di calibrazione BCAA.

Ogni curva riporta RSD% (Residual Standard Deviation %), che è un indice di quanto si scosta il dato dal valore ottimale e che non può essere superiore al 30% (come descritto nella normativa EPA 8000D 2018);^[52] inoltre, riporta il coefficiente di determinazione r^2 , ovvero il rapporto tra varianze. In condizioni ideali tale valore dovrebbe corrispondere a 1, però per una calibrazione reale lineare si accettano valori di $r^2 \geq 0,99$.

7.2.2 Errori e incertezze

In questo paragrafo è riportata la trattazione statistica relativa alla valutazione dei contributi di incertezza che si incontrano durante la validazione del metodo che è stata svolta sulla base delle procedure operative aziendali. L'incertezza deriva da diverse fonti, come ad esempio diluizioni, calibrazioni, ripetibilità, taratura e pesata. Ogni contributo viene considerato per il calcolo dell'incertezza globale e viene espresso mediante scarti tipo.^[53]

Innanzitutto, si è calcolata la componente dell'incertezza derivante da sostanze pure considerando lo standard primario con minore grado di purezza percentuale, P%, (DBAA, P% = 95%). I valori percentuali di purezza sono stati identificati mediante i relativi certificati di analisi e vengono riportati in **tabella 7.6**.

Tabella 7.6: standard primari HAAS

Analita	Purezza (P%) [%]	Incertezza Tipo [%]	Produttore
MCAA	99	0.289	Sigma Aldrich
DCAA	98	0.577	Supelco
TCAA	99	0.289	Sigma Aldrich
MBAA	97	0.866	Sigma Aldrich
DBAA	95	1.443	Supelco
BCAA	96	1.155	Sigma Aldrich

L'incertezza tipo percentuale sulla purezza per ogni standard primario è stata calcolata assumendo una distribuzione rettangolare uniforme utilizzando la seguente formula:

$$Inc. tipo \% = \frac{100 - P\%}{2\sqrt{3}}$$

Come anticipato sopra, ai fini del calcolo si considera il contributo dell'incertezza del composto a minore purezza, per cui il valore da tenere in considerazione è quello relativo al DBAA: 1,443 %.

Questo calcolo è importante perché fornisce un componente che viene successivamente composto con le incertezze derivanti da volumi e diluizioni con lo scopo di ottenere le incertezze finali sul titolo. La distribuzione rettangolare è stata utilizzata anche per definire le incertezze sulla micropipetta, mentre per la vetreria (matraccio) è stata utilizzata la distribuzione triangolare.

La distribuzione rettangolare assume la probabilità uniforme di avere un certo valore all'interno dell'intervallo determinato dall'incertezza, mentre la distribuzione triangolare definisce che il valore centrale della distribuzione è più probabile dei valori che si trovano agli estremi dell'incertezza.^[54]

Dato che per la vetreria si è considerata la distribuzione triangolare, al denominatore del termine relativo al matraccio compare un fattore $\sqrt{6}$, mentre nel termine relativo alla micropipetta compare al denominatore un fattore $\sqrt{3}$ perché la distribuzione utilizzata è di tipo rettangolare.

Del composto puro è stata preparata una soluzione di concentrazione 1000 mg/L in acqua. Sono stati pesati 10 mg in un matraccio da 10 ± 0.025 mL. Da tale soluzione è stata preparata la "soluzione mix madre" (vedi paragrafo 6.2.1) prelevando i volumi, in un singolo prelievo, con una micropipetta da 200 μ L; a tale volume la norma ISO 8655-2:2002 attribuisce un errore massimo permesso di 2.2 μ L.

L'incertezza sul titolo (bias) è stata calcolata con la seguente relazione:

$$\begin{aligned}
 \text{Inc. Titolo(Bias)\%} &= \sqrt{\text{Inc. Tipo}\%^2 + \sqrt{\left(\frac{\Delta V_{\text{prelevato}}}{\sqrt{3} \cdot V_{\text{micropipetta}}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{\text{matraccio}}}{\sqrt{6} \cdot V_{\text{matraccio}}}\right)^2} \cdot 100 \\
 &= \sqrt{1.443^2 + \sqrt{\left(\frac{2.2}{\sqrt{3} \cdot 200}\right)^2 + \left(\frac{0.025}{\sqrt{6} \cdot 10}\right)^2}} \cdot 100 = 1.65\%
 \end{aligned}$$

Dove:

- $\Delta V_{prelevato} = 2.2 \mu\text{L}$, incertezza massima sul volume prelevato fornita dalla norma ISO 8655-2:2002);
- $V_{micropipetta} = 200 \mu\text{L}$, volume nominale massimo micropipetta;
- $\Delta V_{matraccio} = 0.025 \text{ mL}$, incertezza massima sul volume del matraccio;
- $V_{matraccio} = 10 \text{ mL}$, volume nominale massimo matraccio;

Il termine $\sqrt{\left(\frac{\Delta V_{prelevato}}{\sqrt{3} \cdot V_{micropipetta}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{matraccio}}{\sqrt{6} \cdot V_{matraccio}}\right)^2} \cdot 100$ corrisponde all'incertezza percentuale sul volume (*Inc. V%*). Tiene conto del volume massimo prelevato dalla micropipetta e del volume massimo nominale del matraccio e rispettive incertezze su tali volumi.

Le soluzioni di calibrazione sono state preparate in matracci da 1 mL. In **tabella 7.7** sono riportati gli errori relativi percentuali sui volumi prelevati per la costituzione delle soluzioni di ogni punto di calibrazione e sui volumi del matraccio (1 mL). Viene poi calcolata l'incertezza relativa totale percentuale per ogni punto di calibrazione dalla quale viene calcolata l'incertezza di calibrazione totale.

Tabella 7.7: Calcolo delle incertezze relative sui volumi di prelievo e sui volumi finali.

Punti di cal.	V-Micropipetta [μL]	Errore massimo permesso ISO 8655-2:2002 [μL]	V erogato [μL]	Inc.rel. V prelevato [%]	inc.rel. V finale matraccio 1 mL [%]	Inc. rel. Tot [%]	Inc. di calibrazione [%]
CAL_1	200	2.2	100	1.270	1.021	1.629	2.615
CAL_2	200	2.2	100	1.270	1.021	1.629	
CAL_3	200	2.2	100	1.270	1.021	1.629	
CAL_4	200	2.2	20	6.351	1.021	6.432	
CAL_5	200	2.2	50	2.540	1.021	2.738	
CAL_6	200	2.2	100	1.270	1.021	1.629	

I valori riportati in tabella sono stati ottenuti utilizzando le seguenti relazioni:

$$Inc. rel. V_{prelevato} (\%) = \frac{\Delta V_{prelevato} / \sqrt{3}}{V_{erogato}} \cdot 100$$

$$Inc. rel V_{fin-matraccio 1mL} (\%) = \frac{\Delta V_{matraccio}}{V_{matraccio}} \cdot \frac{100}{\sqrt{6}}$$

$$Inc. rel. Totale (\%) = \sqrt{Inc. rel. V_{prelevato} (\%)^2 + Inc. rel. V_{fin-matraccio 1mL} (\%)^2}$$

Si è poi calcolata la media aritmetica tra le incertezze relative totali dei livelli di calibrazione che fornisce l'incertezza di calibrazione (*Inc. Cal. %* = 2.615%).

7.2.3 Validazione

I processi di validazione del metodo devono soddisfare i parametri e i requisiti descritti nel Capitolo 4.

Per la determinazione del LOD e del LOQ sono stati preparati sette campioni in matrice pulita con gli analiti alla minima concentrazione (10 ppb) in acqua Levissima per simulare la matrice di acqua potabile. In **tabella 7.8** sono riportati i valori delle concentrazioni (ppb) degli analiti presenti nelle sette misure ripetute effettuate.

Tabella 7.8: Concentrazione analiti nelle sette misure ripetute.

Analiti	Val 1	Val 2	Val 3	Val 4	Val 5	Val 6	Val 7
MCAA	10.490	12.260	12.540	8.091	9.742	12.630	11.880
DCAA	9.337	10.570	9.641	9.944	10.610	10.550	8.779
TCAA	10.320	11.840	10.120	11.060	10.090	10.360	11.460
MBAA	9.438	9.310	8.856	8.498	9.481	9.278	8.040
DBAA	10.300	11.170	11.520	10.090	11.620	9.945	10.560
BCAA	12.940	10.360	10.170	11.160	11.670	10.440	11.280

Si calcola poi la media delle concentrazioni ottenute per ogni analita e la deviazione standard utilizzando la seguente equazione:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_1^7 (C_i - \bar{C})^2}{N}}$$

In **tabella 7.9** sono riportate le medie e le deviazioni standard calcolate.

Tabella 7.9: Media concentrazioni ripetute e deviazione standard.

Analita	Media concentrazioni [ppb]	SD
MCAA	10.95	1.71
DCAA	9.93	0.71
TCAA	10.66	0.70
MBAA	9.11	0.55
DBAA	10.65	0.69
BCAA	11.00	0.96

Utilizzando questi due valori è quindi possibile, come descritto nel capitolo 5, determinare MDL (=LOD) e LOQ (**tabella 7.10**).

$$MDL = 3,14 \cdot SD$$

$$LOQ = 3,14 \cdot 3,18 \cdot SD = k_q \cdot SD$$

Tabella 7.10: Valori MDL e LOQ determinati per ogni analiti.

Analiti	MDL [ppb]	LOQ [ppb]	CAL_01 [ppb]
MCAA	5.384	17.120	20
DCAA	2.226	7.079	10
TCAA	2.205	7.011	10
MBAA	1.715	5.453	10
DBAA	2.163	6.880	10
BCAA	3.028	9.629	10

Dai valori di LOQ determinati sono state decise le concentrazioni del primo punto di calibrazione della curva come riportato in tabella.

Sono state poi effettuate sette misure del bianco (acqua Levissima, matrice pulita) per verificare l'assenza di interferenti. Inoltre, a seguito dell'analisi delle sette misure e quindi del calcolo dell'MDL sono state verificate le due condizioni di accettabilità dello studio degli MDL descritte nel capitolo 4:

- MDL sempre inferiore di RL (CAL_01);
- media concentrazioni ottenute sempre inferiore di 10 · MDL;

La valutazione dell'accuratezza e della precisione è un passaggio molto importante nella validazione del metodo. Queste si basano sulla ripetibilità e riproducibilità. Nel lavoro di tesi svolto è stata valutata la ripetibilità riguardante l'operato di una singola persona impiegando la stessa strumentazione.

Sono stati scelti 3 livelli di controllo (come da norma ISO 17025/2018) ed effettuate 11 misure ripetute per ognuno di essi:

- *livello 1*: LOQ, 20 ppb per MCAA, gli altri HAAS a 10 ppb;
- *livello 2*: 3 x LOQ, essendo che tre volte LOQ per MCAA sarebbe uguale al limite di legge (60 ppb), si è deciso insieme al correlatore di saltare questo livello per tale analita, quindi gli altri a 30 ppb;
- *livello 3*: poiché il limite di legge (60 ppb), si riferisce alla somma dei 5 HAAS, si è considerato come se gli HAAS si trovassero singolarmente nel campione; quindi, a questo livello sono state formate soluzioni con ogni acido aloacetico considerato alla concentrazione di 60 ppb.

Anche in questo caso i campioni sono stati preparati in acqua Levissima come matrice. I risultati delle concentrazioni (in ppb) ottenute per le 11 misure ripetute per ogni livello sono riportati in **tabella 7.11**.

Tabella 7.11: Risultati 11 misure ripetute per i tre livelli di controllo per ogni analita.

	Analita	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11
Liv 1	MCAA	17.19	18.97	21.46	21.51	21.67	22.52	22.84	23.51	23.96	24.72	24.89
	DCAA	10.02	11.14	11.19	11.22	11.23	11.26	11.27	11.33	11.53	12.72	12.92
	TCAA	10.17	10.48	10.66	10.68	10.77	10.92	10.94	11.06	11.53	12.05	12.51
	MBAA	9.52	9.62	9.66	10.20	10.22	10.39	10.42	10.54	10.62	11.11	11.56
	DBAA	10.09	10.23	10.32	10.36	10.62	10.89	11.35	11.53	11.69	12.31	13.17
	BCAA	9.64	9.94	10.42	10.45	10.64	10.67	11.26	11.32	11.77	11.83	12.23
Liv 2	MCAA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DCAA	28.27	28.44	30.19	31.38	31.55	31.64	32.11	32.56	32.57	32.95	33.09
	TCAA	30.62	31.23	31.78	31.84	32.46	32.46	32.57	32.80	33.23	33.73	34.66
	MBAA	26.16	26.69	27.55	27.71	28.16	28.21	28.38	29.04	29.08	29.21	29.34
	DBAA	29.08	29.51	29.69	30.15	30.37	30.54	30.58	31.38	31.49	32.09	32.71
	BCAA	29.36	29.60	30.04	30.42	30.44	30.65	31.23	31.99	32.28	32.99	33.62
Liv 3	MCAA	49.45	50.92	52.04	52.18	52.84	54.61	55.18	55.64	56.91	57.56	60.97
	DCAA	57.70	58.91	59.17	59.20	59.70	59.98	60.01	60.07	60.12	62.24	62.32
	TCAA	59.29	59.89	60.03	60.03	60.52	60.62	60.87	60.88	61.42	61.64	62.18
	MBAA	47.36	49.39	50.19	51.08	51.53	51.73	52.81	52.81	53.05	53.35	54.24
	DBAA	59.25	59.27	59.70	60.32	60.73	60.94	61.01	61.76	62.21	62.38	62.69
	BCAA	58.50	59.19	59.25	59.80	60.38	60.87	60.96	61.39	61.81	62.40	62.92

Pero ogni livello sono state eseguite diverse valutazioni, innanzitutto è stato calcolato il recupero medio percentuale per ogni analita utilizzando la relazione:

$$R\% = \frac{\bar{C}}{C_{attesa}} \cdot 100$$

dove C_{attesa} corrisponde al valore di concentrazione di ogni livello (vedi sopra).

Il laboratorio, valutata la tipologia di trattamento del campione, si è posto un minimo recupero percentuale pari all'80%. Nel metodo sviluppato i recuperi percentuali sono compresi tra 85,99% e 114.39%. In **tabella 7.12** vengono riportati i valori di recupero percentuale degli analiti nei tre differenti livelli considerati.

Tabella 7.12: Recupero percentuale di ogni analita per livello.

Analita	R% Liv. 1	R% Liv. 2	R% Liv. 3
MCAA	110.56	-	90.65
DCAA	114.39	104.47	99.91
TCAA	110.70	108.30	101.12
MBAA	103.51	93.80	85.99
DBAA	111.42	102.30	101.55
BCAA	109.24	103.82	101.13

Per quanto riguarda la precisione, seguendo quanto scritto nel Capitolo 4 si è determinato il CV% (Coefficiente di Variazione percentuale) calcolando prima la deviazione standard e la media delle concentrazioni per ogni livello.

Poiché questo è un metodo interno al laboratorio e non vi sono normative specifiche per la determinazione di acidi aloacetici con sistema HPLC-MS/MS, non vi sono valori del CV% su cui confrontarsi. Pertanto, in questo caso si è calcolato il $CV\%_{Horwitz}$ utilizzando l'Equazione di Horwitz:

$$CV\%_{Horwitz} = 2^{1-0.5 \cdot \log\left(\frac{C_{corretta}}{10^9}\right)}$$

Dove $C_{corretta} = (C_{attesa teorica} \cdot 0.01 \cdot Inc.Titolo\%) + C_{attesa teorica}$

Una volta calcolato il $CV\%_{Horwitz}$ lo si confronta con il CV% ottenuto dalle 11 misure ripetute. In particolare, deve risultare:

$$0.5 < HorRat = \frac{CV\%}{CV\%_{Horwitz}} < 1.3$$

Sotto lo 0,5 si è in condizioni ideali di precisione. [64]

Come ulteriore verifica della precisione, essendo che i valori di CV%_{Horwitz} ottenuti per le concentrazioni considerate risultano alti (compresi tra 24 e 31 a seconda dell'analita e del livello di concentrazione), i valori di CV% determinati sono stati confrontati con i valori di CV% riportati in un application note Agilent "Determination of Haloacetic Acids in Drinking Water by LC/MS/MS"[65].

Seguendo il manuale UNICHIM 179/1[62] bisogna verificare che il rapporto tra il CV% calcolato e il CV% interlaboratorio riferito al singolo analita rientri in questo intervallo:

$$0.57 < \frac{CV\%}{CV\%_{interlaboratorio}} < 1.43$$

Sotto il valore di 0.57 si è in condizioni ottimali di precisione.

In **Tabella 7.13** vengono riportati media, SD, CV%, CV%_{Horwitz}, HorRat, CV%_{ApplicationNote} e rapporto CV%/ CV%_{ApplicationNote} per ogni analita per ogni livello di concentrazione.

Tabella 7.13: Concentrazione media, SD, CV%, CV%_{Horwitz} e HorRat per gli analiti ad ogni livello.

	Analita	C media [ppb]	SD	CV%	CV% _{Horwitz}	HorRat	CV% _{Application Note}	CV%/CV% _{Application Note}
Liv.1	MCAA	22.113	2.359	10.670	28.759	0.371	11.7	0.912
	DCAA	11.439	0.786	6.868	31.921	0.215	6.5	1.057
	TCAA	11.070	0.697	6.293	31.921	0.197	8.6	0.732
	MBAA	10.351	0.624	6.031	31.921	0.189	6.4	0.942
	DBAA	11.142	0.976	8.763	31.921	0.275	9.2	0.953
	BCAA	10.924	0.822	7.528	31.921	0.236	9.5	0.792
Liv.2	MCAA	-	-	-	-	-	-	-
	DCAA	31.341	1.689	5.391	27.056	0.199	6.5	0.829
	TCAA	32.489	1.136	3.497	27.056	0.129	8.6	0.407
	MBAA	28.139	1.044	3.710	27.056	0.137	6.4	0.580
	DBAA	30.690	1.121	3.653	27.056	0.135	9.2	0.397
	BCAA	31.147	1.400	4.495	27.056	0.166	9.5	0.473
Liv.3	MCAA	54.391	3.334	6.130	24.376	0.252	11.7	0.524
	DCAA	59.947	1.352	2.256	24.376	0.093	6.5	0.347
	TCAA	60.670	0.850	1.401	24.376	0.057	8.6	0.163
	MBAA	51.595	2.005	3.886	24.376	0.159	6.4	0.607
	DBAA	60.933	1.226	2.012	24.376	0.083	9.2	0.219
	BCAA	60.679	1.405	2.316	24.376	0.095	9.5	0.244

I valori di CV% determinati vengono utilizzati per determinare l'incertezza composta relativa alle misure associate al livello di concentrazione preso in esame.

L'incertezza composta (**Tabella 7.15**) è stata calcolata utilizzando la seguente relazione:

$$Inc. Comp. \% = \sqrt{CV\%^2 + Inc. Titolo\%^2 + Inc. Cal\%^2 + Inc. Tar\%^2 + Inc. BIAS^2}$$

Inc. Tar% (incertezza di taratura percentuale) viene determinata utilizzando un ICV (Independent Calibration Verification), ovvero un campione a concentrazione nota dove gli analiti provengono da standard diversi rispetto a quelli in uso per preparare il Mix. La retta di taratura viene ritenuta valida con una tolleranza massima del $\pm 20\%$ sul valore trovato per il materiale di riferimento (ICV). Il contributo dell'incertezza sulla taratura, fornito tenendo conto della distribuzione rettangolare uniforme, viene determinato tramite la relazione: ^[54]

$$Inc. Tar\% = \frac{20}{\sqrt{3}} = 11.55\%$$

Tale approccio risulta ottimale per le calibrazioni multicomponente perché ha il vantaggio di non dover valutare ogni volta la singola retta di taratura, ma ci si può avvalere di un criterio di accettabilità massimo.

Inc. BIAS% (incertezza di BIAS) è un altro contributo per il calcolo dell'incertezza composta. Deriva dalla verifica di esattezza del metodo (Test-t), per il quale si determina il t-value per ogni analita per ogni livello utilizzando la seguente relazione:

$$t = \frac{|\bar{C} - C_{attesa}|}{\sqrt{\frac{SD^2}{11} + \left(\frac{Inc. Titolo\% \cdot \bar{C}}{100}\right)^2}}$$

Il valore così trovato viene confrontato con il valore $t_{critico}$ tabulato corrispondente a 10 gradi di libertà per un livello di confidenza del 95% (= 2,23).

Risulta quindi che:

- Se $t > t_{critico}$, allora $Inc.BIAS\% = \frac{|100-\bar{R}\%|}{\sqrt{3}}$;
- Se $t \leq t_{critico}$, allora $Inc.BIAS\% = 0$;

In **tabella 7.14** vengono riportati i t-value calcolati per ogni analita nei tre livelli di concentrazione e il valore di *Inc.BIAS%*.

Tabella 7.14: t-value e Inc.BIAS% per analita per i 3 livelli di concentrazione.

Analita	Livello 1		Livello 2		Livello 3	
	t-value	Inc.BIAS%	t-value	Inc.BIAS%	t-value	Inc.BIAS%
MCAA	2.69	6.10	-	-	3.97	5.40
DCAA	4.98	8.31	1.89	0.00	0.05	0.00
TCAA	4.00	6.18	4.13	4.79	0.65	0.00
MBAA	1.40	0.00	3.17	3.58	7.24	8.09
DBAA	3.38	6.59	1.15	0.00	0.88	0.00
BCAA	3.10	5.34	1.76	0.00	0.63	0.00

L'incertezza da associare alla misura è l'incertezza estesa (*Inc.Est%*). Questa viene ottenuta moltiplicando l'incertezza composta per un fattore di copertura *K*. Se il numero di gradi di libertà è maggiore o uguale a 10, per questo caso sono state effettuate 11 misure ripetute, *K* è uguale a 2 e corrisponde ad una probabilità del 95.4% che i risultati rientrino nell'intervallo.

In **tabella 6.15** vengono riportati i valori di incertezza composta e incertezza estesa calcolati.

Tabella 7.15: Valori determinati dell'incertezza composta ed estesa.

Analita	Livello 1		Livello 2		Livello 3	
	Inc.Comp.%	Inc.Est.%	Inc.Comp.%	Inc.Est.%	Inc.Comp.%	Inc.Est.%
MCAA	17.11	34.23	-	-	14.44	28.88
DCAA	16.06	32.13	13.07	26.14	12.12	24.24
TCAA	14.82	29.64	13.30	26.61	11.99	23.98
MBAA	13.35	26.70	12.98	25.95	14.91	29.82
DBAA	16.19	32.38	12.46	24.91	12.08	24.16
BCAA	15.07	30.13	12.73	25.46	12.13	24.26

Si può notare che per ogni analita sono stati ottenuti 3 valori di incertezza estesa (uno per livello, per MCAA due valori). Questi valori oscillano tra il 24% e il 34%.

Se l'intervallo in cui rientrano i valori di incertezza estesa determinati per ogni analita è minore o uguale al 10%, per motivi cautelativi il laboratorio riporterà nel risultato finale il maggiore dei tre purché non si superi mai il 50%. Esso verrà quindi espresso nella forma: $XXX \pm YYY \mu g/L$.

Prima di procedere col calcolo dell'incertezza composta, e quindi dell'incertezza estesa, sono stati effettuati, oltre al test di significatività (Test-t), un test statistico sui dati anomali (Test di Grubbs) e un test di normalità (Test di Kolmogorov-Smirnov).

Test di Grubbs:^[56]

È un test statistico mirato all'identificazione di dati anomali su una serie di dati ottenuti sperimentalmente. In molti casi i risultati sospetti possono essere attribuiti ad errori casuali e si deve valutare se eliminare o meno il sospetto dato anomalo. Il test consigliato dall'ISO per i valori anomali è il test di Grubbs. Questo test confronta la deviazione del valore sospetto dalla media del campione con la deviazione standard del campione. Il valore sospetto è naturalmente il valore più lontano dalla media.

Per utilizzare il test di Grubbs per un valore anomalo, ovvero per verificare l'ipotesi nulla, H_0 , che tutte le misurazioni provengano dalla stessa popolazione, viene calcolato il valore statistico G per ogni dato ottenuto con la seguente relazione:

$$G_i = \frac{|C_i - \bar{C}|}{SD}$$

\bar{C} e SD sono calcolati includendo il valore sospetto, poiché H_0 presuppone che non vi siano valori anomali. Il test ipotizza quindi che la popolazione abbia una distribuzione degli errori normale.

Il valore G trovato per il dato viene confrontato con un valore G_{critico} tabulato. Nel nostro caso (11 misure ripetute e un livello di confidenza del 95%), $G_{\text{critico}} = 2.234$. Se il valore calcolato di G supera il valore critico, il valore sospetto viene eliminato. I valori forniti si riferiscono a un test a due code, il quale è appropriato quando non è noto in anticipo l'intervallo di valori fuori dal quale si ha un dato anomalo.

Idealmente dovrebbero essere effettuate ulteriori misurazioni quando si verifica un valore sospetto, soprattutto se inizialmente sono stati ottenuti solo pochi valori; infatti, quando il numero di misure ripetute è basso, un dato ottenuto deve essere molto diverso dagli altri prima di poter essere rifiutato con sicurezza. Valori aggiuntivi

possono rendere più chiaro se il valore sospetto debba essere rifiutato o meno e ridurranno anche il suo effetto sulla media e sulla deviazione standard se viene mantenuto. Anche per questo motivo sono state ripetute undici misure, in modo da avere un numero elevato di dati ed avere, in questo caso, una maggiore certezza sulla presenza di dati anomali. In **tabella 7.16** Vengono riportati i valori di G calcolati per ogni ripetuta effettuata nei tre livelli.

Tabella 7.16: Valore G per ogni risultato ottenuto dalle 11 ripetute.

	Analita	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
Liv 1	MCAA	2.09	1.33	0.28	0.26	0.19	0.17	0.31	0.59	0.78	1.11	1.18
	DCAA	1.81	0.38	0.32	0.28	0.27	0.23	0.22	0.14	0.12	1.63	1.89
	TCAA	1.29	0.85	0.59	0.56	0.43	0.22	0.19	0.01	0.66	1.41	2.07
	MBAA	1.33	1.17	1.11	0.24	0.21	0.06	0.11	0.30	0.43	1.22	1.94
	DBAA	1.08	0.93	0.84	0.80	0.53	0.26	0.21	0.40	0.56	1.20	2.08
	BCAA	1.57	1.20	0.61	0.58	0.35	0.31	0.41	0.48	1.03	1.10	1.59
Liv 2	MCAA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DCAA	1.82	1.72	0.68	0.02	0.12	0.18	0.46	0.72	0.73	0.95	1.04
	TCAA	1.65	1.11	0.62	0.57	0.03	0.03	0.07	0.27	0.65	1.09	1.91
	MBAA	1.90	1.39	0.56	0.41	0.02	0.07	0.23	0.86	0.90	1.03	1.15
	DBAA	1.44	1.05	0.89	0.48	0.29	0.13	0.10	0.62	0.71	1.25	1.80
	BCAA	1.28	1.11	0.79	0.52	0.51	0.36	0.06	0.60	0.81	1.32	1.77
Liv 3	MCAA	1.48	1.04	0.71	0.66	0.47	0.07	0.24	0.37	0.76	0.95	1.97
	DCAA	1.66	0.77	0.57	0.55	0.18	0.02	0.05	0.09	0.13	1.70	1.75
	TCAA	1.62	0.92	0.75	0.75	0.18	0.06	0.24	0.25	0.88	1.14	1.78
	MBAA	2.11	1.10	0.70	0.26	0.03	0.07	0.61	0.61	0.73	0.88	1.32
	DBAA	1.37	1.36	1.01	0.50	0.17	0.01	0.06	0.67	1.04	1.18	1.43
	BCAA	1.55	1.06	1.02	0.63	0.21	0.14	0.20	0.51	0.80	1.22	1.59

Si può notare come ogni valore di G calcolato sia inferiore al valore G_{critico} (= 2.234). Non vi sono quindi dati anomali da eliminare.

Test di Kolmogorov-Smirnov: ^[56]

Il metodo Kolmogorov-Smirnov viene utilizzato per verificare la normalità. Il principio del metodo prevede il confronto della funzione di distribuzione cumulativa del campione con la funzione di distribuzione cumulativa della distribuzione ipotizzata. Se i dati sperimentali si discostano sostanzialmente dalla distribuzione attesa, le due funzioni risulteranno ampiamente separate. Se però i dati concordano strettamente con la distribuzione prevista, le due funzioni non saranno molto distanti. La statistica del test è data dalla massima differenza verticale tra le due funzioni e viene confrontata con dei valori tabulati (Z_{critico}).

Innanzitutto, sono stati trasformati i dati ottenuti nella variabile normale standard, z. Data la funzione di distribuzione normale:

$$f(C) = \frac{1}{SD \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{(C-\bar{C})^2}{2 \cdot SD^2}}$$

Si calcola il valore $f(C_i)$ per ogni valore ottenuto, dopo di che si calcola la cumulata per ogni misura successiva:

$$Cumulata_i = \frac{i - 1}{N}$$

Essendo 11 le misure si calcolano 11 cumulate, la cumulata 1 avrà $i = 1$, la cumulata 2 avrà $i = 2$ etc. N è il numero di analisi ripetute (= 11).

Si può ora calcolare z per ogni analita per ogni ripetuta utilizzando la seguente equazione:

$$z = f(C_i) - Cumulata_i$$

Sarà questo valore a venire confrontato con $z_{critico} = 0.262$, valore tabulato per $N = 11$ e un livello di confidenza del 95%.

In **tabella 7.17** vengono riportati i valori di distribuzione normale calcolati per ogni dato e le undici cumulate calcolate, mentre in **tabella 7.18** vengono riportati i valori z calcolati.

Tabella 7.17: Cumulate e distribuzioni normali.

	Analita	f(C1)	f(C2)	f(C3)	f(C4)	f(C5)	f(C6)	f(C7)	f(C8)	f(C9)	f(C10)	f(C11)
Liv 1	MCAA	0.018	0.091	0.391	0.399	0.426	0.569	0.621	0.723	0.783	0.865	0.880
	DCAA	0.035	0.352	0.376	0.390	0.395	0.410	0.415	0.445	0.546	0.949	0.970
	TCAA	0.098	0.199	0.278	0.288	0.333	0.415	0.426	0.494	0.745	0.920	0.981
	MBAA	0.091	0.122	0.133	0.405	0.417	0.525	0.544	0.619	0.667	0.888	0.974
	DBAA	0.141	0.175	0.200	0.212	0.297	0.398	0.584	0.655	0.713	0.884	0.981
	BCAA	0.059	0.116	0.270	0.282	0.365	0.379	0.658	0.685	0.848	0.865	0.944
Liv 2	MCAA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DCAA	0.035	0.043	0.248	0.509	0.549	0.570	0.676	0.765	0.767	0.830	0.850
	TCAA	0.050	0.134	0.266	0.284	0.490	0.490	0.528	0.608	0.743	0.863	0.972
	MBAA	0.029	0.083	0.286	0.341	0.508	0.527	0.591	0.806	0.816	0.848	0.875
	DBAA	0.075	0.146	0.186	0.315	0.388	0.447	0.461	0.731	0.762	0.894	0.964
	BCAA	0.101	0.135	0.215	0.302	0.307	0.361	0.524	0.726	0.791	0.906	0.961
Liv 3	MCAA	0.069	0.149	0.240	0.254	0.321	0.526	0.594	0.646	0.775	0.829	0.976
	DCAA	0.048	0.222	0.283	0.290	0.427	0.510	0.518	0.536	0.551	0.955	0.960
	TCAA	0.052	0.179	0.226	0.226	0.430	0.477	0.593	0.598	0.811	0.873	0.962
	MBAA	0.017	0.136	0.242	0.399	0.487	0.527	0.728	0.728	0.766	0.809	0.482
	DBAA	0.085	0.088	0.157	0.309	0.434	0.502	0.525	0.750	0.851	0.881	0.994
	BCAA	0.061	0.145	0.155	0.266	0.416	0.554	0.579	0.694	0.789	0.890	0.945
	Ripetuta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Cumulata	0.000	0.091	0.182	0.273	0.364	0.455	0.545	0.636	0.727	0.818	0.909

Tabella 7.18: Valori z calcolati.

	Analita	z1	z2	z3	z4	z5	z6	z7	z8	z9	z10	z11
Liv 1	MCAA	0.018	0.001	0.209	0.126	0.062	0.114	0.076	0.087	0.056	0.047	-0.029
	DCAA	0.035	0.261	0.194	0.117	0.031	-0.045	-0.131	-0.192	-0.181	0.130	0.061
	TCAA	0.098	0.108	0.096	0.015	-0.030	-0.040	-0.119	-0.142	0.018	0.102	0.072
	MBAA	0.091	0.031	-0.049	0.132	0.053	0.071	-0.001	-0.017	-0.060	0.070	0.065
	DBAA	0.141	0.084	0.018	-0.061	-0.067	-0.056	-0.039	0.018	-0.015	0.066	0.072
BCAA	0.059	0.025	0.088	0.009	0.001	-0.076	0.113	0.048	0.121	0.046	0.035	
Liv 2	MCAA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DCAA	0.035	-0.048	0.066	0.237	0.186	0.116	0.130	0.128	0.039	0.011	-0.059
	TCAA	0.050	0.043	0.084	0.011	0.126	0.035	-0.017	-0.029	0.016	0.044	0.063
	MBAA	0.029	-0.008	0.104	0.068	0.144	0.073	0.046	0.170	0.089	0.029	-0.034
	DBAA	0.075	0.055	0.004	0.042	0.024	-0.008	-0.085	0.095	0.035	0.076	0.055
BCAA	0.101	0.044	0.033	0.029	-0.057	-0.093	-0.022	0.090	0.063	0.088	0.052	
Liv 3	MCAA	0.069	0.058	0.059	-0.019	-0.043	0.072	0.048	0.010	0.048	0.011	0.067
	DCAA	0.048	0.131	0.101	0.018	0.064	0.055	-0.027	-0.100	-0.176	0.137	0.051
	TCAA	0.052	0.088	0.044	-0.047	0.066	0.022	0.048	-0.039	0.084	0.055	0.053
	MBAA	0.017	0.045	0.060	0.126	0.124	0.072	0.182	0.091	0.039	-0.009	-0.427
	DBAA	0.085	-0.003	-0.024	0.036	0.071	0.048	-0.020	0.114	0.124	0.063	0.085
BCAA	0.061	0.054	-0.027	-0.007	0.052	0.099	0.034	0.057	0.062	0.071	0.035	

Si può notare come tutti i valori siano inferiori a z_{critico} (= 0.262) e dunque la distribuzione è normale.

8 Interferenti endocrini

8.1 Metodo sviluppato

Il metodo sviluppato per la determinazione di due interferenti endocrini, Bisfenolo A e 17- β -estradiolo, fa riferimento al metodo normato EPA 8321 e a due metodi ufficiali trovati in letteratura scientifica:

- Rapporto ISTISAN 11/18, ISSN 1123-3117, “Interferenti endocrini nelle acque destinate al consumo umano in Italia: strumenti metodologici per un’indagine conoscitiva estesa a diversi sistemi idrici”; ^[60]
- European Commission, JRC technical reports, EUR 27970 EN, “Water Framework Directive Watch List Method Analysis of 17- β -estradiol and estrone”, 2016; ^[61]

8.1.1 Procedura sperimentale

Il metodo sviluppato per la determinazione di bisfenolo A e 17- β -estradiolo prevede un’iniezione diretta del campione di acqua nel sistema HPLC-MS/MS, previa filtrazione, in caso esso si presenti torbido.

Nello sviluppo del metodo sono state effettuate diverse prove. Di seguito viene riportato un confronto tra due cromatogrammi ottenuti, quello rappresentato in **figura 8.1** è stato ottenuto utilizzando come fase A semplicemente acqua (ultra pura per LC-MS), quello rappresentato in **figura 8.2** è stato ottenuto utilizzando come fase A acqua LC-MS con 0.1% di idrossido di ammonio, tale soluzione è stata formata aggiungendo 0.385 mL di NH₄OH in un litro di acqua. Entrambi i cromatogrammi sono stati ottenuti con campioni di acqua Levissima contenente gli standard degli analiti alla concentrazione di 10 ppb ($\mu\text{g/L}$).

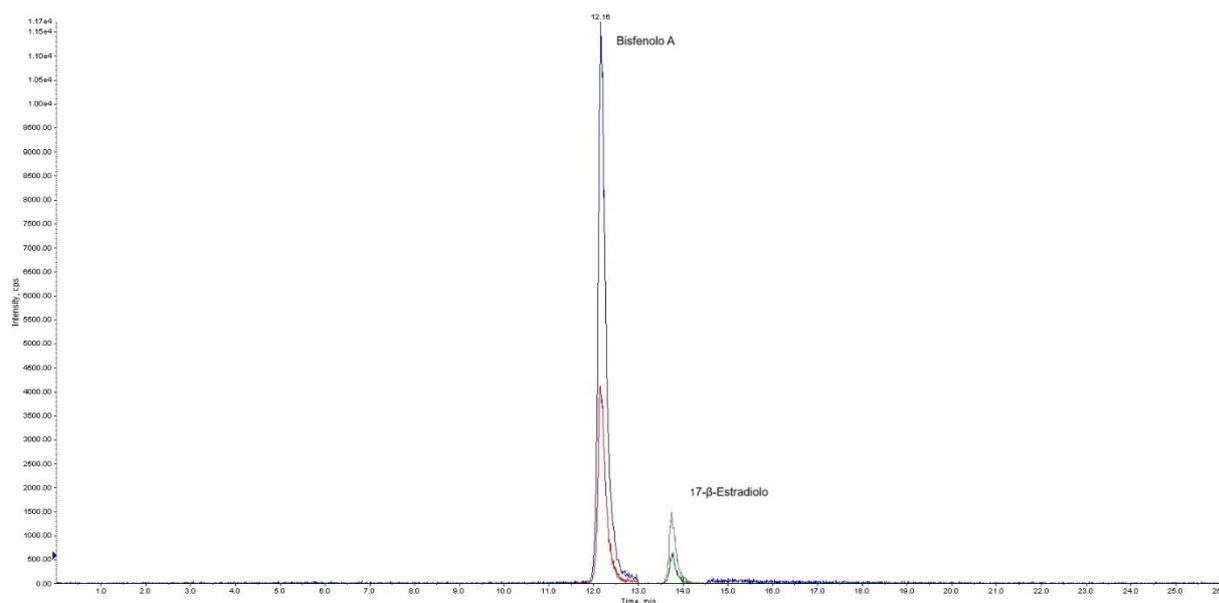


Figura 8.1: Cromatogramma di prova ottenuto utilizzando come fase A acqua.

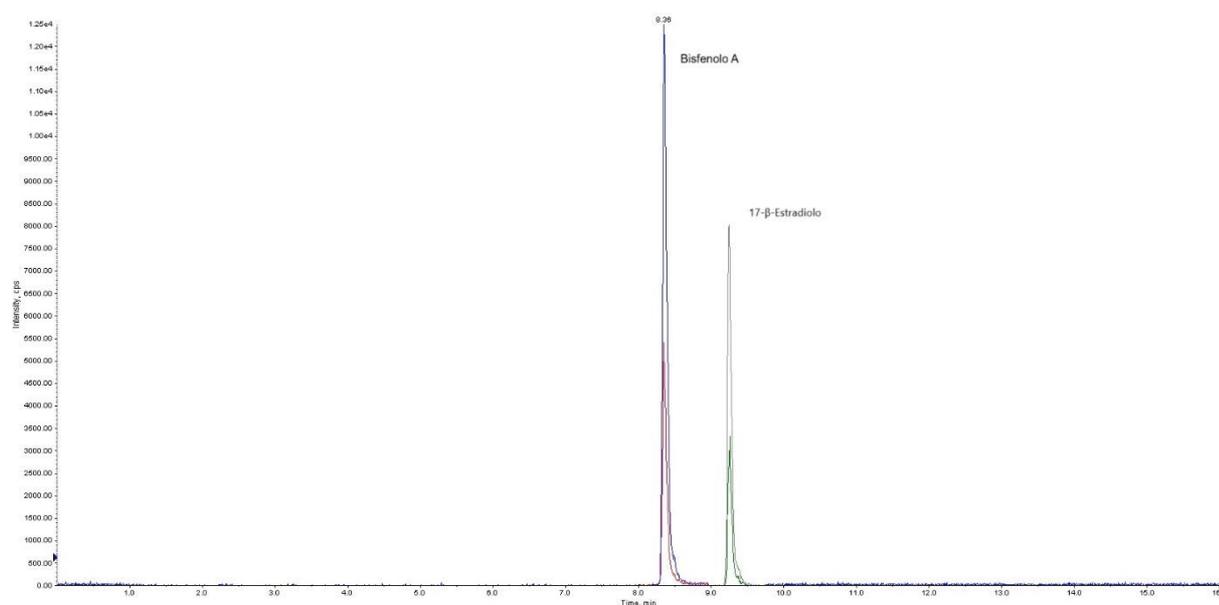


Figura 8.2: Cromatogramma ottenuto utilizzando come fase A acqua con 0.1% di NH₄OH.

Si può notare una diminuzione dei tempi di ritenzione di entrambi gli analiti oltre che un significativo restringimento delle bande dei segnali ottenuti. Questo ha permesso di diminuire la durata della corsa da 26 minuti a 16 minuti.

Trovate le condizioni ottimali si è proceduto con le prove di validazione a tre livelli di concentrazione differenti, ognuna studiata in batch di 11 campioni in modo tale, analogamente a quanto fatto con il metodo per la determinazione degli HAAS, da avere 10 gradi di libertà per un corretto confronto di ripetibilità.

8.1.2 Analisi strumentale

Uno degli obiettivi del lavoro di tesi era quello di riuscire a sviluppare i due metodi trattati quanto più simili tra loro in termini di sostanze e apparecchiature utilizzate. Questo per motivi di praticità ed economicità. Per tale ragione molte delle sostanze utilizzate nei due metodi, oltre che il sistema HPLC-MS/MS e la colonna cromatografica sono gli stessi. Tuttavia, per ovvie ragioni, il metodo strumentale è differente.

In **tabella 8.1** vengono riportati i parametri ottimizzati per l'HPLC e l'MS, in **tabella 8.2** il gradiente ed infine, in **tabella 8.3** i tempi di ritenzione ed i parametri di acquisizione MRM (01 = transizione principale, 02 = transizione secondaria) utilizzati per l'identificazione e la quantificazione dei due interferenti endocrini presi in considerazione in questo elaborato di tesi.

Tabella 8.1: Parametri HPLC e MS.

HPLC	
Colonna	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HPH-C18, 3.0 x 150 mm, 2.7 µm (p/n 693975-502).
Temperatura colonna [°C]	40
Volume di iniezione [µL]	20
Fase Mobile	A: Acqua 0.1% Idrossido d'ammonio B: Metanolo
Flusso [µL/min]	300
Tempo corsa [minuti]	16
MS	
Sorgente ionica	Turbo Spray
Potenziale di entrata (EP) [V]	-10
Tensione Spray Ionico [V]	-4500
Temperatura sorgente [°C]	350
Polarità	Negativa

Tabella 8.2: Gradiente fasi mobili.

Gradiente		
Tempo [Min]	A %	B %
0.00	50	50
2.00	50	50
5.00	10	90
13.00	10	90
13.1	50	50
16.00	50	50

Tabella 8.3: Tempi di ritenzione e parametri di acquisizione MRM.

MRM						
Composto	Tempo di ritenzione [Min]	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
Bisfenolo A 01	8.45	227.0	212.0	-70.0	-30.0	-15.0
Bisfenolo A 02	8.45	227.0	133.0	-70.0	-30.0	-15.0
17- β -Estradiolo 01	9.26	271.0	143.0	-95.0	-54.0	-6.0
17- β -Estradiolo 02	9.26	271.0	183.0	-95.0	-54.0	-6.0

I campioni reali vengono analizzati in lotti, di 20 di campioni al massimo, simili tra loro per matrice e processati impiegando la stessa procedura nello stesso momento. Per ogni lotto vengono preparati una serie di controlli (vedi Paragrafo 7.1.2): CCV, MB, LCS, LCSD, MS, MSD.

8.2 Risultati e discussione

In questo paragrafo sono illustrati i risultati relativi alla calibrazione e alla validazione del metodo sviluppato per la determinazione dei due interferenti endocrini considerati. È stata prima di tutto costruita una retta di taratura e successivamente è stata eseguita la validazione sperimentale.

8.2.1 Calibrazioni

La retta di calibrazione è stata realizzata preparando sei vial da 1 mL. Le soluzioni relative ai punti di calibrazione sono state preparate in matracci da 1 mL come descritto in **tabella 8.4** partendo da una “soluzione mix madre” contenente gli standard dei due analiti alla concentrazione di 100 ppb.

Tabella 8.4: Punti di calibrazione.

Punti di cal.	Concentrazione [ppb]	Volume [μ L] Mix Madre	Volume Acqua [μ L] LC-MS	Volume [μ L] CAL_04
CAL_01	0.5	-	950	50
CAL_02	1	-	900	100
CAL_03	5	50	950	-
CAL_04	10	100	900	-
CAL_05	20	200	800	-
CAL_06	50	500	500	-

Le vial relative ai sei punti di calibrazione sono state fatte analizzare utilizzando il metodo strumentale descritto nel Paragrafo 8.1.2.

Vengono riportati di seguito i cromatogrammi ottenuti (**figure 8.3-8.8**).

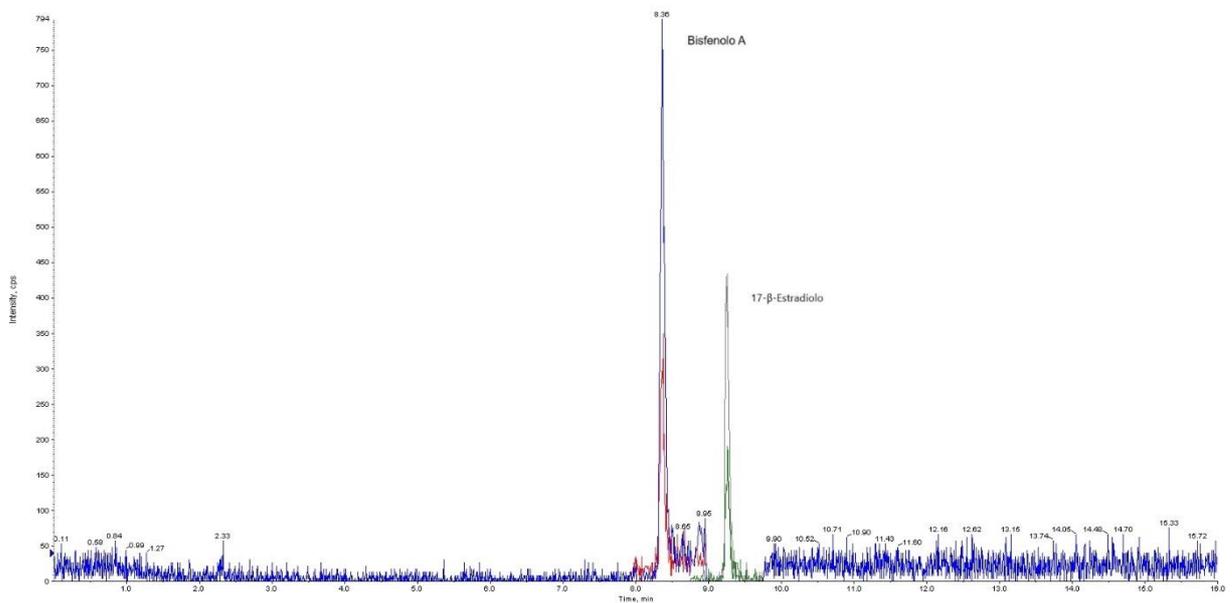


Figura 8.3: Cromatogramma del primo punto di calibrazione (CAL_01).

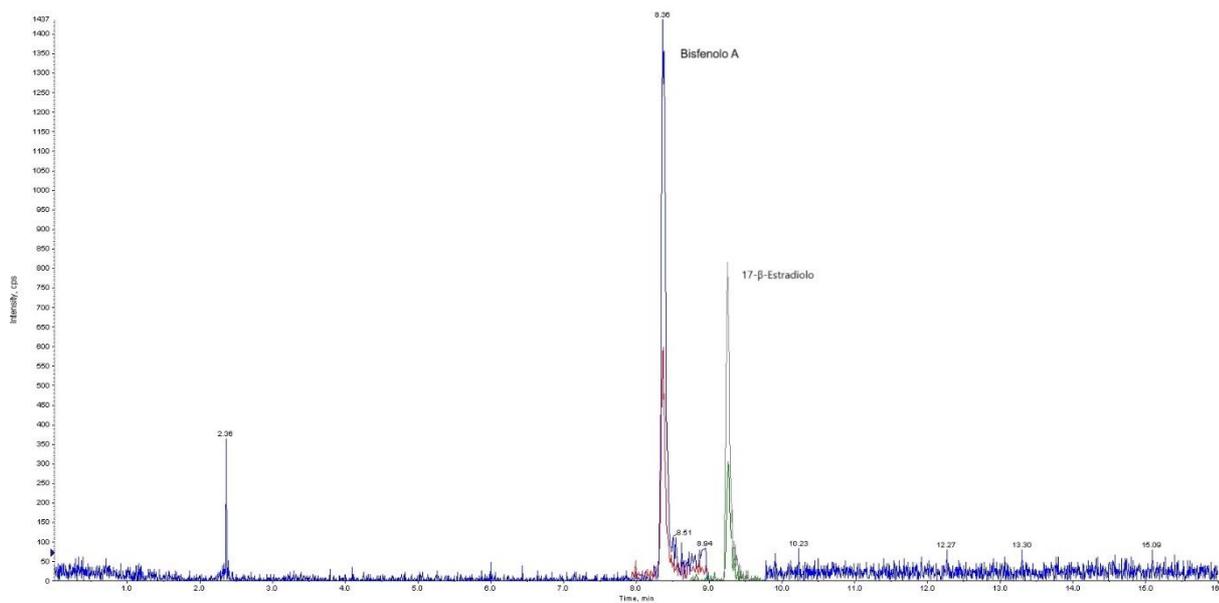


Figura 8.4: Cromatogramma del secondo punto di calibrazione (CAL_02).

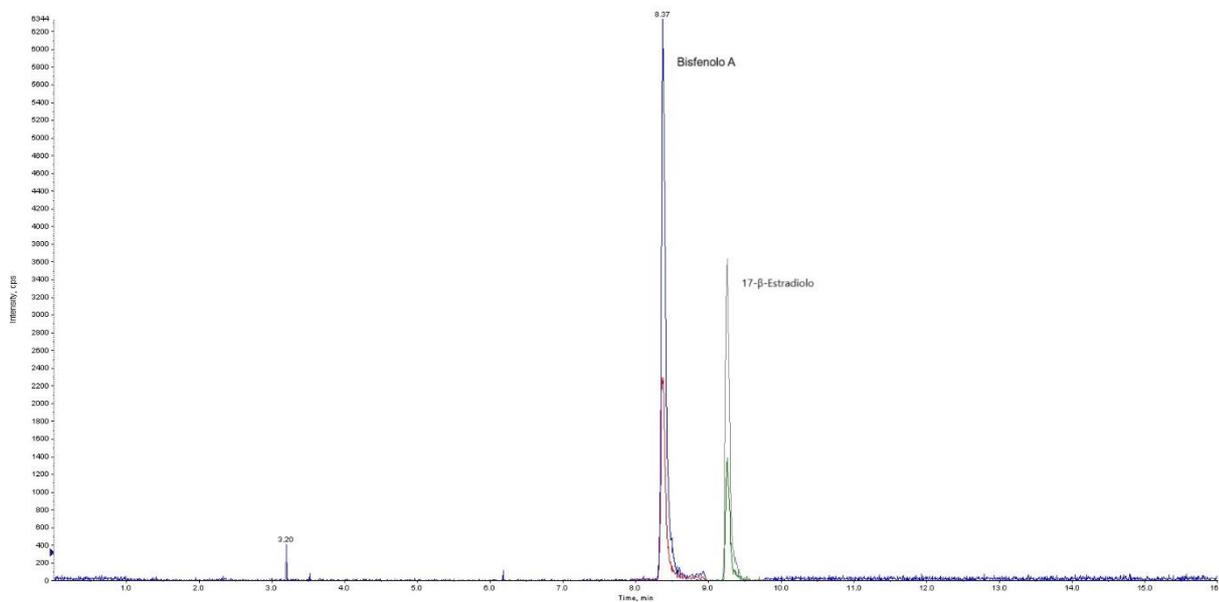


Figura 8.5: Cromatogramma del terzo punto di calibrazione (CAL_03).

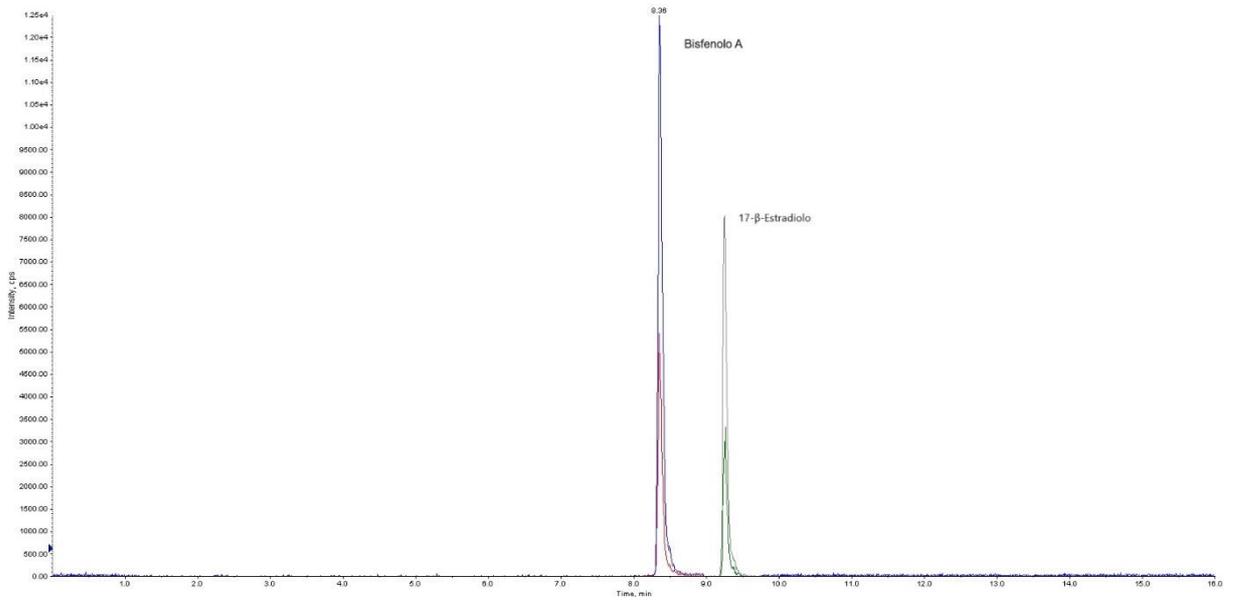


Figura 8.6: Cromatogramma del quarto punto di calibrazione (CAL_04).

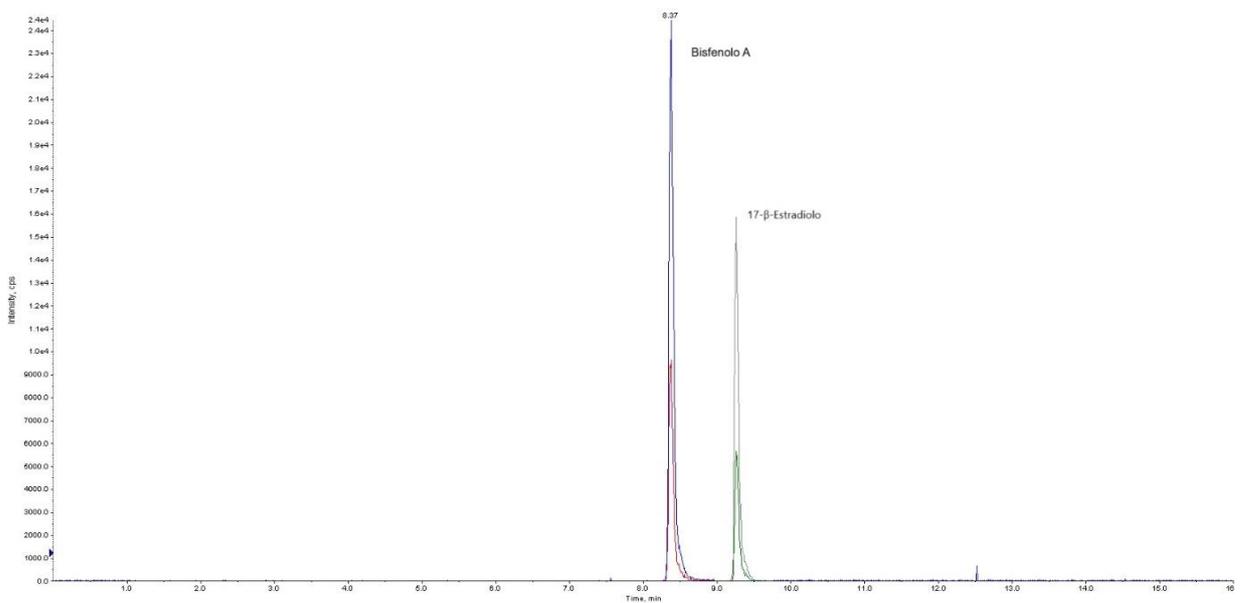


Figura 8.7: Cromatogramma del quinto punto di calibrazione (CAL_05).

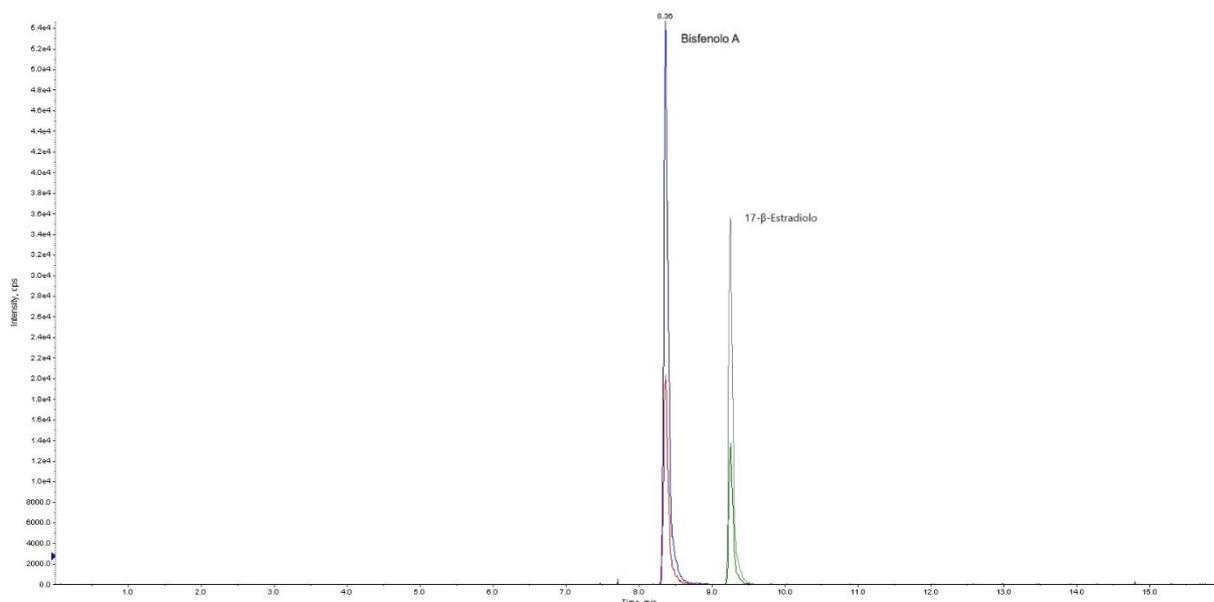


Figura 8.8: Cromatogramma del sesto punto di calibrazione (CAL_06).

Di seguito vengono riportati i dati delle integrazioni (**tabella 8.5**) e le relative rette di calibrazione per bisfenolo A e 17-β-estradolo.

Tabella 8.5: Risultati integrazioni curva di calibrazione.

Punti di Calibrazione	Area	
	Bisfenolo A	17-β-Estradiolo
CAL_01	2916.45	1670.60
CAL_02	5995.32	3323.48
CAL_03	27139.69	15580.32
CAL_04	55507.63	31587.50
CAL_05	107743.30	61596.81
CAL_06	243472.70	148616.40

Le curve di calibrazione (**figure 8.9 e 8.10**) si ottengono ponendo sull'asse delle ascisse la concentrazione (vedi **tabella 8.4**) e sull'asse delle ordinate l'area ottenuta dalle integrazioni dei picchi. Il fitting è lineare e forzato sull'origine come descritto nel metodo EPA 8321. ^[51]

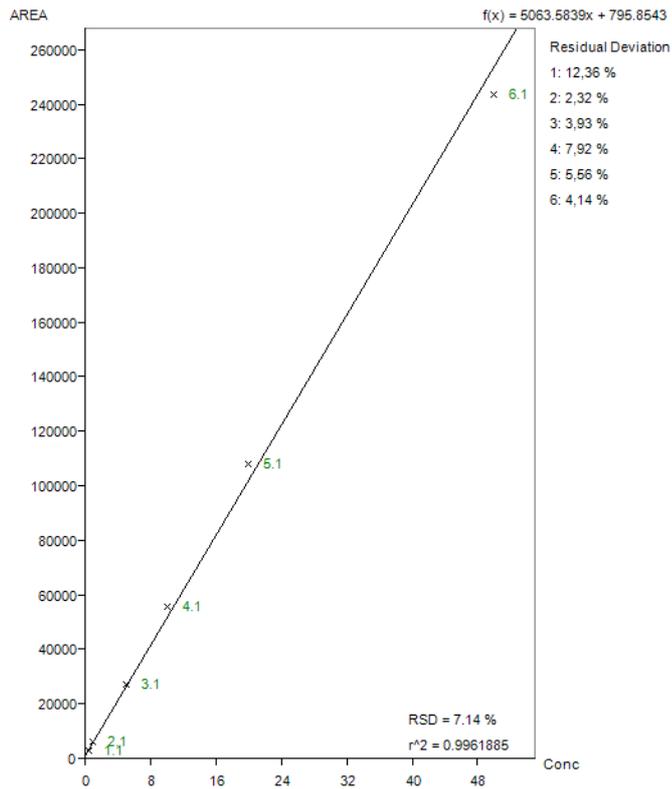


Figura 8.9: Curva di calibrazione del bisfenolo A.

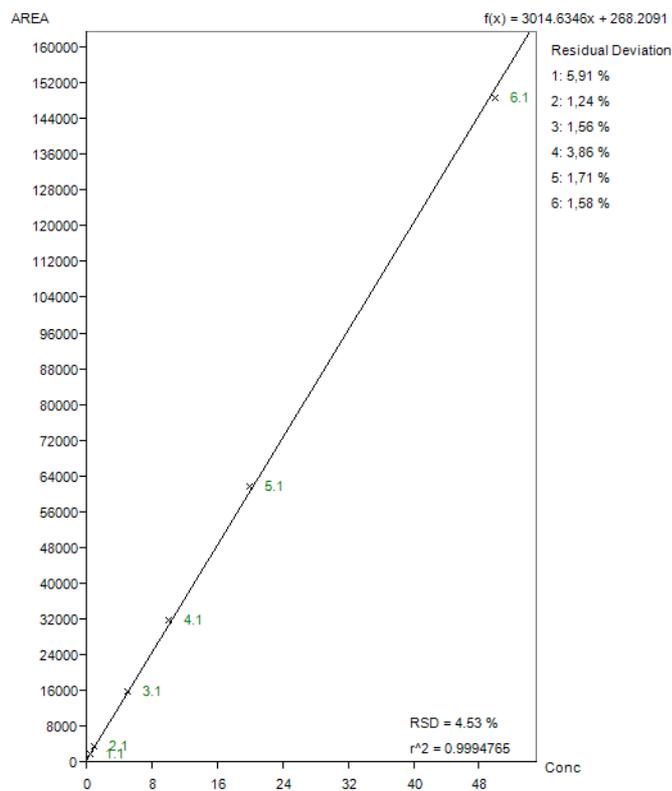


Figura 8.10: Curva di calibrazione del 17- β -estradiolo.

Ogni curva riporta RSD% e il coefficiente di determinazione r^2 . Si può notare come in entrambe le curve ottenute si abbia un r^2 maggiore di 0.99.

8.2.2 Errori ed incertezze

La valutazione dei contributi di incertezza che si incontrano nel metodo è stata svolta sulla base delle procedure operative aziendali, analogamente a quanto fatto per la validazione del metodo per la determinazione degli HAAS.

Si è innanzitutto calcolata la componente di incertezza derivante da sostanze pure considerando lo standard primario a minore grado di purezza percentuale (17- β -estradiolo, P% = 97%). I valori percentuali di purezza sono stati identificati mediante i relativi certificati di analisi (**tabella 8.6**).

Tabella 8.6: Standard primari Interferenti Endocrini.

Analita	Purezza (P%) [%]	Incertezza Tipo [%]	Produttore
Bisfenolo A	99	0.289	Supelco
17- β -Estradiolo	97	0.866	Supelco

Come per gli HAAS l'incertezza tipo percentuale sulla purezza per ogni standard primario è stata calcolata assumendo una distribuzione rettangolare.

Ai fini del calcolo si considera il contributo di incertezza del composto a minore purezza, per cui il valore da tenere in considerazione è quello relativo al 17- β -estradiolo: 0.866%.

Pure in questo caso la distribuzione rettangolare è stata utilizzata anche per definire le incertezze sulla micropipetta, mentre per la vetreria (matraccio) è stata utilizzata la distribuzione triangolare.

Il composto puro è stato diluito per ottenere una soluzione di 1000 mg/L in metanolo. Sono stati pesati 10 mg in un matraccio da 10 ± 0.025 mL. Da tale soluzione è stata preparata la soluzione "mix madre" (vedi Paragrafo 7.2.1) prelevando i volumi, in un singolo prelievo, con una micropipetta da 200 μ L; la norma ISO 8655-2:2002 a tale volume attribuisce un errore massimo permesso di 2.2 μ L.

L'incertezza sul titolo (bias) è stata calcolata con la seguente relazione:

$$\begin{aligned}
 \text{Inc. Titolo(Bias)\%} &= \sqrt{\text{Inc. Tipo}\%^2 + \sqrt{\left(\frac{\Delta V_{\text{prelevato}}}{\sqrt{3} \cdot V_{\text{micropipetta}}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{\text{matraccio}}}{\sqrt{6} \cdot V_{\text{matraccio}}}\right)^2} \cdot 100 \\
 &= \sqrt{0.866^2 + \sqrt{\left(\frac{2.2}{\sqrt{3} \cdot 200}\right)^2 + \left(\frac{0.025}{\sqrt{6} \cdot 10}\right)^2}} \cdot 100 = 1.18\%
 \end{aligned}$$

Dove:

- $\Delta V_{\text{prelevato}} = 2.2 \mu\text{L}$, incertezza massima sul volume prelevato fornita dalla norma ISO 8655-2:2002);
- $V_{\text{micropipetta}} = 200 \mu\text{L}$, volume nominale massimo micropipetta;
- $\Delta V_{\text{matraccio}} = 0.025 \text{ mL}$, incertezza massima sul volume del matraccio;
- $V_{\text{matraccio}} = 10 \text{ mL}$, volume nominale massimo matraccio;

Il termine $\sqrt{\left(\frac{\Delta V_{\text{prelevato}}}{\sqrt{3} \cdot V_{\text{micropipetta}}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{\text{matraccio}}}{\sqrt{6} \cdot V_{\text{matraccio}}}\right)^2} \cdot 100$ corrisponde all'incertezza percentuale sul volume ($\text{Inc. V}\%$). Tiene conto del volume massimo prelevato dalla micropipetta e del volume massimo nominale del matraccio e rispettive incertezze su tali volumi.

Le soluzioni di calibrazione sono state preparate in matracci da 1mL. In **tabella 8.7** vengono riportati gli errori relativi percentuali sui volumi prelevati per la costruzione delle soluzioni di ogni punto di calibrazione e sui volumi del matraccio (1 mL); viene poi calcolata l'incertezza relativa totale percentuale per ogni punto di calibrazione dalla quale viene calcolata l'incertezza di calibrazione totale.

Tabella 8.7: Calcolo delle incertezze relative sui volumi di prelievo e sui volumi finali.

Punti di cal.	V-Micropipetta [μL]	Errore massimo permesso [μL] ISO 8655-2:2002	V erogato [μL]	Inc.rel. V prelevato [%]	inc.rel. V finale matraccio 1 mL [%]	Inc. rel. Tot [%]	Inc. di calibrazione [%]
CAL_1	200	2.2	50	2.540	1.021	2.738	1.856
CAL_2	200	2.2	100	1.270	1.021	1.629	
CAL_3	200	2.2	50	2.540	1.021	2.738	
CAL_4	200	2.2	100	1.270	1.021	1.629	
CAL_5	200	2.2	200	0.635	1.021	1.202	
CAL_6	1000	5.5	500	0.635	1.021	1.202	

I valori riportati in tabella sono stati ottenuti utilizzando le seguenti relazioni:

$$Inc. rel. V_{prelevato} (\%) = \frac{\Delta V_{prelevato} / \sqrt{3}}{V_{erogato}} \cdot 100$$

$$Inc. rel. V_{fin-matraccio 1mL} (\%) = \frac{\Delta V_{matraccio} / \sqrt{6}}{V_{matraccio}} \cdot 100$$

$$Inc. rel. Totale (\%) = \sqrt{Inc. rel. V_{prelevato} (\%)^2 + Inc. rel. V_{fin-matraccio 1mL} (\%)^2}$$

Si può notare nella tabella come per il sesto punto di calibrazione (CAL_06) sia stato effettuato un prelievo non con la pipetta da 200 µL, ma con la pipetta da 1000 µL sempre con un singolo prelievo. la norma ISO 8655-2:2002 a tale volume attribuisce un errore massimo permesso di 5.5 µL.

È stata poi calcolata la media aritmetica tra le incertezze relative totali dei livelli di calibrazione, la quale fornisce l'incertezza di calibrazione (Inc.Cal.% = 1.856%).

8.2.3 Validazione

I processi di validazione del metodo devono soddisfare i parametri e i requisiti descritti nel Capitolo 4. Per la determinazione del LOD e del LOQ sono stati preparati sette campioni in matrice pulita con gli analiti ad una concentrazione pari a metà CAL_01 (0.25 ppb) in acqua Levissima per simulare la matrice di acqua potabile.

In **tabella 8.8** vengono riportati i valori delle concentrazioni (ppb) registrati dallo strumento degli analiti presenti nelle sette misure effettuate.

Tabella 8.8: Concentrazione analiti nelle sette ripetute.

Analiti	Val 1	Val 2	Val 3	Val 4	Val 5	Val 6	Val 7
Bisfenolo A	0.243	0.220	0.253	0.249	0.253	0.230	0.230
17-β-Estradiolo	0.264	0.251	0.256	0.288	0.259	0.246	0.244

È stata poi calcolata la media delle sette misure ripetute per ogni analita e la deviazione standard (**tabella 8.9**).

Tabella 8.9: Media concentrazioni ripetute e deviazioni standard.

Analita	Media concentrazioni [ppb]	SD
Bisfenolo A	0.240	0.013
17-β-Estradiolo	0.258	0.015

Utilizzando questi due valori sono stati calcolati MDL (= LOD) e LOQ (**tabella 8.10**):

- $MDL = 3,14 \cdot SD$
- $LOQ = 3,14 \cdot 3,18 \cdot SD = k_q \cdot SD$

Tabella 8.10: Valori di MDL e LOQ determinati per i due analiti.

Analiti	MDL [ppb]	LOQ
Bisfenolo A	0.040	0.129
17-β-Estradiolo	0.047	0.150

Come LOQ sono stati ottenuti valori molto bassi (0.13 e 0.15 ppb) per motivi cautelativi, pur non essendoci il bisogno di scendere così tanto con la concentrazione. Infatti, essendo il limite di legge per il bisfenolo A di 2.5 ppb, anche per il 17-β-estradiolo ci siamo rifatti a tale limite. Pertanto, si è deciso, insieme al correlatore, di tenere come LOQ e quindi come primo punto curva il valore di 0.5 ppb.

Sono state poi effettuate sette misure ripetute di bianco (acqua Levissima, matrice pulita) per verificare l'assenza di eventuali interferenti. Inoltre, con il calcolo dell'MDL sono state verificate le due condizioni di accettabilità dello studio degli MDL descritte nel Capitolo 4:

- MDL sempre inferiore a RL (RL = 0.25 ppb);
- Media delle concentrazioni ottenute sempre inferiore a $10 \cdot MDL$.

Dopo aver determinato MDL e LOQ si è proceduto con la valutazione dell'accuratezza e della precisione, che si basano su ripetibilità e riproducibilità. È stata valutata la ripetibilità riguardante l'operato di una singola persona impiegando la stessa strumentazione.

Sono stati scelti tre livelli di concentrazione di controllo (ISO 17025/2018) e per ognuno di essi sono state ripetute undici misure:

- *livello 1*: LOQ, 0.5 ppb;
- *livello 2*: 3 x LOQ, 1.5 ppb;
- *livello 3*: Limite di legge, 2.5 ppb.

Anche in questo caso come matrice si è utilizzata l'acqua Levissima. I risultati ottenuti per i tre livelli di concentrazione sono riportati in **tabella 8.11**.

Tabella 8.11: Risultati undici misure ripetute per i tre livelli di concentrazioni per ogni analita.

	Analita	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11
Liv 1	Bisfenolo A	0.469	0.480	0.492	0.494	0.497	0.500	0.501	0.502	0.512	0.514	0.527
	17-β-Estradiolo	0.480	0.493	0.497	0.500	0.504	0.506	0.507	0.509	0.515	0.518	0.528
Liv 2	Bisfenolo A	1.319	1.340	1.392	1.392	1.410	1.465	1.480	1.485	1.499	1.522	1.528
	17-β-Estradiolo	1.426	1.448	1.449	1.451	1.457	1.459	1.475	1.496	1.496	1.507	1.514
Liv 3	Bisfenolo A	2.303	2.365	2.393	2.401	2.419	2.433	2.443	2.447	2.511	2.526	2.549
	17-β-Estradiolo	2.387	2.411	2.429	2.450	2.451	2.489	2.497	2.527	2.566	2.586	2.588

Per ogni livello è stato calcolato il recupero percentuale (R%) medio per ogni analita utilizzando la seguente relazione:

$$R\% = \frac{\bar{C}}{C_{attesa}} \cdot 100$$

dove C_{attesa} è il valore della concentrazione corrispondente ad ogni livello. Il laboratorio si è posto come minimo recupero percentuale l'80%. Nel metodo sviluppato i recuperi percentuali trovati sono compresi tra il 98% e il 101%. I valori di recupero percentuale determinati sono riportati in **tabella 8.12**.

Tabella 8.12: Recupero percentuale medio di ogni analita per livello di concentrazione.

Analita	R% Liv. 1	R% Liv. 2	R% Liv. 3
Bisfenolo A	99.78	95.95	97.42
17-β-Estradiolo	101.01	98.05	99.57

Per la valutazione della precisione, come scritto nel Capitolo 4, è stato determinato il CV% calcolando prima la deviazione standard e la media delle concentrazioni per

ogni livello.

Non essendoci metodi normati specifici per la determinazione degli interferenti endocrini considerati, per il confronto dei valori di CV% ci si è rifatti ai valori di CV% di riproducibilità interlaboratorio riportati nei due metodi nominati ad inizio capitolo:

- per il bisfenolo A: Rapporto ISTISAN 11/18, ISSN 1123-3117;^[60]
- per il 17- β -estradiolo: European Commission, JRC technical reports, EUR 27970 EN.^[61]

Per comodità li chiameremo CV%_{BisfA} e CV%_{Estr} (in generale CV%_{interlaboratorio}, riferito all'analita in questione). I valori trovati in questi due metodi sono:

- CV%_{bisfA} = 8;
- CV%_{Estr} = 10.9;

Seguendo il manuale UNICHIM 179/1^[62] bisogna verificare che il rapporto tra il CV% calcolato e il CV% interlaboratorio riferito al singolo analita rientri in questo intervallo:

$$0.57 < \frac{CV\%}{CV\%_{interlaboratorio}} < 1.43$$

Sotto il valore di 0.57 si è in condizioni ottimali di precisione.

In **tabella 8.13** vengono riportati media, SD, CV%, CV%_{interlaboratorio}, e rapporto CV%/CV%_{interlaboratorio} per ogni analita nei tre diversi livelli di concentrazione.

Tabella 8.13: Concentrazione media, SD, CV%, CV%_{interlaboratorio} e CV%/CV%_{interlaboratorio} per i due analiti ad ogni livello.

	Analita	C media [ppb]	SD	CV%	CV% BisfA	CV% Estr	CV%/CV%interlab
Liv 1	17- β -Estradiolo	0.505	0.013	2.574	-	10.900	0.236
	Bisfenolo A	0.499	0.016	3.164	8.000	-	0.396
Liv 2	17- β -Estradiolo	1.471	0.029	1.946	-	10.900	0.178
	Bisfenolo A	1.439	0.072	5.027	8.000	-	0.628
Liv 3	17- β -Estradiolo	2.489	0.070	2.832	-	10.900	0.260
	Bisfenolo A	2.435	0.073	2.983	8.000	-	0.373

I valori di CV% vengono utilizzati per determinare l'incertezza composta relativa alle misure associate al livello di concentrazione preso in esame.

L'incertezza composta (**tabella 8.15**) è stata calcolata utilizzando la seguente relazione:

$$Inc. Comp. \% = \sqrt{CV\%^2 + Inc. Titolo\%^2 + Inc. Cal\%^2 + Inc. Tar\%^2 + Inc. BIAS^2}$$

Anche per questo metodo risulta: $Inc. Tar\% = \frac{20}{\sqrt{3}} = 11.55\%$

Inc.BIAS% è il contributo dell'incertezza dovuto al mancato superamento del test di esattezza del metodo (test-t). Per questo metodo è pari a zero per entrambi gli analiti per tutti i livelli di concentrazione considerati. Infatti, eseguendo il test-t si ottengono valori di t minori del valore $t_{critico}$ per tutti gli analiti per tutti e tre i livelli.

$$t = \frac{|\bar{C} - C_{attesa}|}{\sqrt{\frac{SD^2}{11} + \left(\frac{Inc. Titolo\% \cdot \bar{C}}{100}\right)^2}}$$

In **tabella 8.14** vengono riportati i valori t trovati potendo confermare quindi che ogni valore t determinato risulta essere inferiore al valore $t_{critico}$ corrispondente a 10 gradi di libertà e un livello di confidenza del 95% ($t_{critico} = 2.23$). Non è quindi necessario aggiungere il contributo di incertezza $Inc. BIAS\% = \frac{|100 - \bar{R}\%|}{\sqrt{3}}$ a nessuna incertezza composta calcolata.

Tabella 8.14: t-value per ogni analita per i tre livelli di concentrazione

Analita	t-value		
	Livello 1	Livello 2	Livello 3
17-β-Estradiolo	0.715	1.486	0.297
Bisfenolo A	0.143	2.162	1.756

L'incertezza da associare alla misura è l'incertezza estesa ($Inc. Est\%$) questa la si ottiene moltiplicando l'incertezza composta per un fattore di copertura K. Essendo 10 i gradi di libertà, $K = 2$ e corrisponde ad un livello di probabilità del 95.4% che i

risultati rientrino nell'intervallo.

In **tabella 7.15** vengono riportati i valori di incertezza composta ed estesa calcolati.

Tabella 8.15: Valori determinati di incertezza composta ed estesa.

Analita	Livello 1		Livello 2		Livello 3	
	Inc.Comp.%	Inc.Est%	Inc.Comp.%	Inc.Est%	Inc.Comp.%	Inc.Est%
17-β-Estradiolo	12.16	24.33	12.05	24.09	9.54	19.08
Bisfenolo A	12.30	24.61	12.91	25.82	9.59	19.17

Per ogni analita sono stati ottenuti tre valori di incertezza estesa (uno per livello di concentrazione), tali valori oscillano tra il 19% e il 25%.

Se l'intervallo in cui rientrano i valori di incertezza estesa determinati per ogni analita è minore o uguale al 10%, per motivi cautelativi, il laboratorio riporterà nel risultato finale il maggiore dei tre purché non si superi il 50%. Il risultato finale verrà quindi espresso nella forma: $XXX \pm YYY \mu g/L$.

Analogamente al metodo per la determinazione degli HAAS, anche nella validazione del metodo per la determinazione degli interferenti endocrini sono stati eseguiti, oltre al test di significatività (Test-t), un test statistico sui dati anomali (Test di Grubbs) e un test di normalità (Test di Kolmogorov-Smirnov).

Test di Grubbs:

In **tabella 8.16** vengono riportati i valori G determinati per ogni analita e per ogni misura nei tre diversi livelli di concentrazione. Tali valori vanno confrontati con il valore $G_{critico}$ per 10 gradi di libertà ed un livello di confidenza del 95% ($G_{critico} = 2.234$).

I valori G sono stati determinati con la seguente relazione:

$$G_i = \frac{|C_i - \bar{C}|}{SD}$$

Tabella 8.16: valore di G per ogni risultato ottenuto dalle 11 ripetute nei tre livelli.

	Analita	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
Liv 1	17-β-Estradiolo	1.93	0.94	0.64	0.42	0.08	0.03	0.17	0.28	0.78	1.00	1.76
	Bisfenolo A	1.88	1.18	0.43	0.33	0.14	0.07	0.11	0.20	0.85	0.97	1.75
Liv 2	17-β-Estradiolo	1.56	0.79	0.76	0.69	0.48	0.41	0.15	0.88	0.88	1.27	1.51
	Bisfenolo A	1.66	1.37	0.65	0.65	0.40	0.36	0.56	0.63	0.83	1.14	1.23
Liv 3	17-β-Estradiolo	1.45	1.11	0.85	0.56	0.54	0.00	0.11	0.54	1.09	1.37	1.40
	Bisfenolo A	1.82	0.97	0.58	0.47	0.23	0.03	0.10	0.16	1.04	1.25	1.56

Si nota come tutti i valori G calcolati siano inferiori al valore di G_{critico} . Non vi sono quindi dati anomali da eliminare.

Test di Kolmogorov-Smirnov:

Sono stati trasformati i dati ottenuti dalle 11 misure ripetute nella variabile normale standard, z. Data la funzione di distribuzione normale:

$$f(C) = \frac{1}{SD \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{(C-\bar{C})^2}{2 \cdot SD^2}}$$

si è calcolato il valore $f(C_i)$ per ogni valore ottenuto. Dopo di che si calcola la cumulata per ogni misura ripetuta successiva tramite la relazione:

$$Cumulata_i = \frac{i - 1}{N}$$

Essendo undici le misure si calcolano undici cumulate. La cumulata 1 avrà $i = 1$, la cumulata due avrà $i = 2$, ecc. N è il numero di misure ripetute (= 11).

Si può ora calcolare la variabile normale standard, z, per ogni analita, per ogni misura e per ogni livello di concentrazione utilizzando la seguente relazione:

$$z = f(C_i) - Cumulata_i$$

Saranno i valori z così calcolati ad essere confrontati con il valore $z_{\text{critico}} = 0.262$, valore tabulato per $N = 11$ e un livello di confidenza del 95%.

In **tabella 8.17** sono riportati i valori di distribuzione normale calcolati per ogni dato e

le undici cumulate calcolate, mentre in **tabella 8.18** vengono riportati i valori z calcolati.

Tabella 8.17: Valori di distribuzione normale e le undici cumulate.

	Analita	f(C1)	f(C2)	f(C3)	f(C4)	f(C5)	f(C6)	f(C7)	f(C8)	f(C9)	f(C10)	f(C11)
Liv 1	17- β -Estradiolo	0.027	0.173	0.260	0.337	0.467	0.513	0.568	0.610	0.782	0.840	0.961
	Bisfenolo A	0.030	0.119	0.335	0.370	0.444	0.530	0.542	0.580	0.802	0.835	0.960
Liv 2	17- β -Estradiolo	0.059	0.214	0.224	0.245	0.316	0.341	0.559	0.811	0.811	0.898	0.935
	Bisfenolo A	0.048	0.085	0.257	0.257	0.343	0.639	0.713	0.736	0.795	0.874	0.890
Liv 3	17- β -Estradiolo	0.074	0.134	0.197	0.289	0.294	0.499	0.544	0.704	0.862	0.915	0.920
	Bisfenolo A	0.034	0.166	0.279	0.318	0.410	0.487	0.541	0.563	0.851	0.894	0.941
	Ripetuta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Cumulata	0.000	0.091	0.182	0.273	0.364	0.455	0.545	0.636	0.727	0.818	0.909

Tabella 8.18: Valori della variabile normale standard, z , calcolati.

	Analita	z1	z2	z3	z4	z5	z6	z7	z8	z9	z10	z11
Liv 1	17- β -Estradiolo	0.027	0.082	0.078	0.064	0.104	0.059	0.023	-0.026	0.055	0.022	0.051
	Bisfenolo A	0.030	0.028	0.153	0.098	0.080	0.075	-0.003	-0.056	0.074	0.017	0.051
Liv 2	17- β -Estradiolo	0.059	0.123	0.042	-0.027	-0.048	-0.114	0.014	0.175	0.084	0.079	0.026
	Bisfenolo A	0.048	-0.006	0.075	-0.016	-0.021	0.184	0.168	0.100	0.068	0.055	-0.019
Liv 3	17- β -Estradiolo	0.074	0.043	0.015	0.016	-0.070	0.044	-0.001	0.068	0.135	0.097	0.010
	Bisfenolo A	0.034	0.075	0.098	0.045	0.047	0.032	-0.004	-0.073	0.124	0.076	0.032

Si può notare come tutti i valori z calcolati risultino essere inferiori a z_{critico} (= 0.262) e dunque la distribuzione è normale.

9 Conclusione

Questo lavoro di tesi ha riguardato lo sviluppo di metodi di analisi per l'identificazione di analiti appartenenti a due classi di composti, acidi aloacetici ed interferenti endocrini, in ottemperanza alla nuova direttiva acque dell'Unione Europea (2020/2184) e conseguente recepimento italiano. Infatti, la normativa ha imposto nuovi limiti di legge per quanto riguarda la loro presenza nelle acque destinate al consumo umano.

Altro scopo ambizioso che ci si è posti è stato mettere a punto metodi che consentano l'iniezione diretta del campione nel sistema HPLC-MS/MS. Si evitano così procedure di trattamento del campione dispendiose sia a livello economico che per il tempo totale di analisi.

I metodi sviluppati (Capitolo 7 e Capitolo 8) sono stati poi validati su tre livelli di concentrazione confermandone l'affidabilità. Allo scopo si è determinato il coefficiente di variazione percentuale (CV%) e lo si è confrontato con il CV% fornito dall'equazione di Horwitz, per il metodo relativo alla determinazione degli acidi aloacetici, e con il CV% interlaboratorio (come descritto dal manuale UNICHIM 179/1) trovato su due metodi ufficiali pubblicati (Rapporto ISTISAN11/18, ISSN 1123-3117 e European Commission, JRC technical reports, EUR 27970 EN) per la determinazione dei due interferenti endocrini considerati.

Nel processo di validazione di entrambi i metodi sviluppati sono state effettuati tre test statistici: Test-t, Test di Grubbs, Test di Kolmogorov-Smirnov.

Il *Test-t* è un test di significatività, cioè un test per la verifica dell'esattezza del metodo. Questo test non è stato "superato" ($t\text{-value} > t_{\text{critico}}$) da alcuni acidi aloacetici, in questa situazione il laboratorio, per motivi cautelativi, ha deciso di aggiungere un contributo di incertezza all'incertezza composta (chiamata incertezza di BIAS%). Mentre, per il metodo riguardante gli interferenti endocrini tutti i t-value calcolati sono risultati essere minori del valore t_{critico} .

Il *Test di Grubbs* è un test di controllo per verificare se nell'insieme di dati ottenuti sono presenti uno o più dati anomali. In caso affermativo tali dati potranno essere eliminati oppure si può ripetere la misura. In entrambi i metodi sviluppati i valori G ottenuti sono sempre risultati minori del G_{critico} dimostrando la validità dei dati ottenuti.

Il *Test di Kolmogorov-Smirnov* è un test di verifica della normalità dei dati ottenuti. Anche in questo caso per entrambi i metodi sviluppati sono stati ottenuti valori z minori del valore z_{critico} confermando quindi che ogni dato ottenuto appartiene ad una distribuzione normale con media e deviazione standard relative al proprio livello di concentrazione.

È stata poi determinata l'incertezza estesa per entrambi i metodi, cioè l'incertezza che viene fornita dal laboratorio insieme al risultato ottenuto dall'analisi. Per il metodo riguardante la determinazione degli acidi aloacetici nelle acque destinate al consumo umano sono stati ottenuti valori compresi tra il 29% e il 34%, a seconda dello specifico acido aloacetico considerato (**tabella 7.15**); mentre, per il metodo riguardante la determinazione del BPA e del 17- β -estradiolo sono stati ottenuti rispettivamente valori di incertezza estesa pari a 25.82% e 24.33% (**tabella 8.15**). Tali valori sono stati ritenuti accettabili dal laboratorio secondo quanto scritto nei paragrafi 7.2.3 e 8.2.3.

Nel processo di validazione non si è ritenuto necessario valutare la robustezza. La sua valutazione è un compito obbligatorio solo nel caso di sviluppo di metodi "da zero". In questo caso entrambi i metodi sviluppati fanno riferimento al metodo normato EPA 8321. Infatti, secondo quanto scritto dall'Istituto superiore di Sanità nella linea guida 16/39^[63]: *"Di solito la robustezza rispetto allo scopo, cioè tipologia di matrici e campo di misura, dei metodi normalizzati pubblicati è stata già dimostrata. Perciò la verifica da parte del laboratorio singolo per l'applicazione di un metodo normalizzato pubblicato di solito non richiede la valutazione della robustezza."*

Una volta concluso il processo di validazione dei metodi sviluppati sono stati compilati i workflow preparativi ufficiali di Agrolab Italia che sono riportati in Appendice 10.1 e Appendice 10.2.

10 Appendici

10.1 Workflow ufficiale acidi aloacetici

AGROLAB Italia S.r.l.

MF-05565-IT

Versione: 2.00

Valido da: 06.10.2023



Pag. 1 di 1

ARCI - EPA 8321 Acidi aloacetici
Procedura di preparazione campioni

METODO : EPA 8321
ANALISI : HAAS
MATRICE : acque

WORKFLOW PREPARATIVO

1 – Pesatura campione:

- Prelevare con pipetta pasteur circa 1 mL di campione acquoso e travasarlo in vial da autocampionatore in vetro
- Aggiungere al campione così preparato un volume pari al 10% dello stesso di FASE mobile A

2 – Prova:

Il campione è mandato a prova per analisi diretta senza pre-concentrazione o trattamenti.

HPLC	
Colonna	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HPH-C18, 3.0 x 150 mm, 2.7 µm (p/n 693975-502).
Temperatura colonna	40 °C
Volume di iniezione	20 µL
Fase Mobile	A: Acqua con 0.05% di acido formico B: Metanolo
Flusso	350
Tempo corsa	15 minuti

3 - Purificazione:

Non è prevista purificazione

10.2 Workflow ufficiale interferenti endocrini

AGROLAB Italia S.r.l.

MF-05564-IT

Versione: 1.00

Valido da: 06.10.2023



Pag. 1 di 1

ARCI_EPA 8321 interferenti endocrini
Procedura di preparazione campioni

METODO : EPA 8321
ANALISI : Interferenti endocrini
MATRICE : acque

WORKFLOW PREPARATIVO

1 – Pesatura campione:

Prelevare con pipetta pasteur circa 1 mL di campione acquoso e travasarlo in vial da autocampionatore in vetro

2 – Prova:

Il campione è mandato a prova per analisi diretta senza pre-concentrazione o trattamenti.

Le condizioni operative da utilizzare sono di seguito riportate

HPLC	
Colonna	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HPH-C18, 3.0 x 150 mm, 2.7 µm (p/n 693975-502).
Temperatura colonna	40 °C
Volume di iniezione	20 µL
Fase Mobile	A: Acqua con 0.1% di ammonio idrossido B: Metanolo
Flusso	300
Tempo corsa	16 minuti

3 - Purificazione:

Non è prevista purificazione

11 Bibliografia

[1] Leonardo Salvemini, *Ambiente Diritto, La tutela dell'acqua*, online:

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:

https://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://eniscuola.eni.com/it-IT/home.html>

[5] *Direttiva 2000/60/CE, 23 ottobre 2000, in materia di "Acque"*

[6] *Direttiva 98/83/CE, 3 novembre 1998, in materia di "Acque"*

[7] *Associazione Italiana acqua di qualità: LA NUOVA DIRETTIVA (UE) 2020/2184 SULLA QUALITÀ DELLE ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO*

<https://www.acquadiqualita.it/it/news/la-nuova-direttiva-ue-2020-2184.php>

[8] *AMBIENTE E NON SOLO... Marco Talluri, Italia ed Europa sono lontane da raggiungere l'obiettivo di qualità "buona" per i fiumi ed i laghi (19/10/2021)*

<https://ambientenonsolo.com/italia-ed-europa-sono-lontane-da-raggiungere-lobiettivo-di-qualita-buona-per-i-fiumi-ed-i-laghi/>

[9] *AGROLAB GROUP ITALIA, Storia e Gruppo*, online:

<https://www3.agrolab.com/it/il-gruppo/chisiamo.html>

[10] *Direttiva Europea 2020/2184, 16 dicembre 2020, in materia di "Acque"*

[11] *ASSOCIAZIONE AMBIENTE E LAVORO, "La Direttiva Europea 2020/2184 e i nuovi standard Europei per l'acqua potabile", 23/03/2023:*

<https://amblav.it/la-direttiva-europea-2020-2184-e-i-nuovi-standard-europei-per-lacqua-potabile/#:~:text=La%20Direttiva%20europea%202020%2F2184%2C%20adottata%20il%2016%20dicembre%202020,la%20protezione%20della%20salute%20umana.>

[12] *ANIMA CONFIDUSTRIA, "Direttiva acqua potabile, cosa cambia in Italia", 09/03/2023:*

<https://www.anima.it/media/comunicati-stampa/direttiva-acqua-potabile-cosa-cambia-in-italia.kl>

[13] *CERTIFICO "Schema di dlgs attuazione della direttiva (UE) 2020/2184", 25/02/2023:*

<https://www.certifico.com/ambiente/356-news-ambiente/18782-schema-di-dlgs-attuazione-direttiva-ue-2020-2184>

[14] *DLGS 23 febbraio 2023 n. 18, "Disciplina della qualità delle acque destinate al consumo umano-Attuazione della direttiva Europea 2020/2184/Ue-Abrogazione del Dlgs 31/2001"*

[15] *Chimica Online: "Acido Cloroacetico":*

<https://www.chimica-online.it/composti-organici/acido-cloroacetico.htm>

[16] *SCRIBD, "Acido Cloroacetico", Moises*

Valdivia Baldomero:

<https://it.scribd.com/document/385876766/acid-o-cloro-acetico#download>

[17] PCC Group, "From shampoo to glyphosate or where monochloroacetic acid is used", 08/08/2017:

<https://www.products.pcc.eu/en/blog/from-shampoo-to-glyphosate-or-where-monochloroacetic-acid-is-used/>

[18] NEW HAMPSHIRE DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL SERVICES, "Haloacetic Acids (five) (HAA5): Health Information Summary", 2018.

[19] Agilent Application Note, "Determination of Haloacetic Acids in Drinking Water by LC/MS/MS"

[20] ULSS 9 Scaligera, "Sottoprodotti della disinfezione con cloro: Valutazione del rischio", Giorgio Moretti, Università degli studi di Padova.

[21] European Commission. *European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife. Report of proceedings from a workshop held in Weybridge, UK, 2–4 December 1996.* Brussels: European Commission, DGXII; 1996. (Report reference, EUR 17549).

[22] Wenzel A, Müller J, Ternes T. *Study on endocrine disrupters in drinking water. Final report.* Francoforte: Fraunhofer IME, ESWE; 2003. (ENV. D. 1/ETU/2000/0083).

[23] Uglea, Constantin V.; Ioan I. Negulescu,

"Synthesis and Characterization of Oligomers", CRC Press, 1991, p. 103.

[24] GRUPPO SANIROMA, "17 beta Estradiolo (Estradiolo)".

<https://www.grupposaniroma.it/analisi-cliniche/17-beta-estradiolo>

[25] ISTITUTO BERNABEU Medicina Reproductiva, "Cos'è l'Estradiolo? Quali sono le funzioni di questo ormone sessuale?".

<https://www.institutobernabeu.com/it/blog/cose-lestradiolo-quali-sono-le-funzioni-di-questo-ormone-sessuale/>

[26] CONFEDERAZIONE SVIZZERA, Ufficio federale della sanità pubblica UFSP, "Bisfenolo A", Dicembre 2020.

[27] Dr. Roberto Gindro, "17 BETA ESTRADIOLO (E2): VALORI ALTI, BASSI E NORMALI", 13/12/2021.

<https://healthy.thewom.it/esami-e-analisi/beta-estradiolo/>

[28] Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock MJ. *Identification of estrogenic chemicals in stw effluents.* *Environ Sci Technol* 1998; 32:1549-58.

[29] Johnson AC Belfroid A, Di Corcia A. *Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent.* *Sci Tot Environ* 2000; 256:16373.

[30] D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, Samperi R. *Fate of natural estrogen*

conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. Sci Total Environ 2003; 302:199-209.

[31] Lange IG, Daxenberger A, Schiffer B, Witters H, Ibarreta D, Meyer HHD. Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Anal Chim Acta* 2002; 473:27-37

[32] Ermawati R, Morimura S, Tang YQ, Liu K, Kida K. Degradation and behavior of natural steroid hormones in cow manure waste during biological treatments and ozone oxidation. *J Biosc Bioeng* 2007; 103:27-31.

[33] Meeker JD, Sathyanarayana S, Swan SH. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009;364(1526):2097-113.

[34] Cousins IT, Staples CA, Klecka GM, Mackay D. A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. *Human Ecol Risk Assess* 2002;8 (5):1107-35.

[35] 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.*

[36] APAT, RTI CTN_SSC 3/2002, *Guida tecniche su metodi di analisi e di monitoraggio - Proposta di Guida Tecnica sui metodi di*

analisi dei suoli contaminati, pp 6-7.

[37] Validazione - master reach, *Garanzia di Qualità dei risultati analitici*, online: www.masterreach.unina.it

[38] A. Shrivastava and V. Gupta, "Method for the determination of limit of detection and limit of quantification of the analytical methods" *Chronicles Young Sci.*, vol. 2, no. 1, p. 21, 2011.

[39] *Presentazione power point, 5.4. Metodi di prova e validazione – Accredia*, online: <https://www.accredia.it>

[40] Norma EPA 8321, "Solvent-Extractable Nonvolatile Compounds by High Performance Liquid Chromatography-Thermospray-Mass Spectrometry (HPLC-TSP-MS) or Ultraviolet (UV) Detection"

[41] VWR Chemicals®, 2022, certificato di analisi Water HiPerSolv CHROMANORM for HPLC LC-MS grade - suitable for UPLC/UHPLC instruments

[42] VWR Chemicals®, 2022, certificato di analisi Methanol HiPerSolv CHROMANORM for HPLC LC-MS grade - suitable for UPLC/UHPLC instruments

[43] Merck KGaA®, 2022, certificato di analisi Acetonitrile Hypergrade for LC-MS LiChrosolv®

[44] VWR Chemicals®, 2022, certificato di analisi Formic acid 99% for LC-MS

[45] Sigma Aldrich®, 2021, certificato di analisi

- chloroacetic Acid-99%*
[46] Supelco®, 2022, *certificato di analisi Dichloroacetic acid PESTANAL™, analytical standard*
- [47] Sigma Aldrich®, 2021, *certificato di analisi Trichloroacetic acid ACS reagent, >= 99.0 %*
- [48] Sigma Aldrich®, 2022, *certificato di analisi Bromoacetic acid reagent grade, 97 %*
- [49] Supelco®, 2022, *certificato di analisi Dichloroacetic acid PESTANAL™, analytical standard*
- [50] Sigma Aldrich®, 2021, *certificato di analisi Bromochloroacetic acid*
- [51] Metodo EPA 8321, Febbraio 2007, USA.
- [52] Metodo EPA 8000 D, Marzo 2018, USA.
- [53] 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.*
- [54] ACCREDIA, P. Bianco, ISO/IES 17035, *"Validazione, Incertezza, Assicurazione Qualità dei Dati" 2011.*
- [55] Unichim and S. Spezia, *"Il calcolo dell'incertezza di misura nei metodi EPA", Milano, 2018.*
- [56] James N Miller, Jane C Miller, *"Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry", sesta edizione, 2010.*
- [57] Sigma Aldrich®, 2022, *certificato di analisi ammonium hydroxide solution – 28% NH₃ in H₂O, ≥ 99.99% trace metals basis.*
- [58] Supelco®, 2022, *certificato di analisi Bisfenolo A.*
- [59] Supelco®, 2022, *certificato di analisi 17-β-Estradiolo.*
- [60] Rapporto ISTISAN 11/18, ISSN 1123-3117, *"Interferenti endocrini nelle acque destinate al consumo umano in Italia: strumenti metodologici per un'indagine conoscitiva estesa a diversi sistemi idrici", 2018.*
- [61] - European Commission, JRC technical reports, EUR 27970 EN, *"Water Framework Directive Watch List Method Analysis of 17-β-estradiol and estrone", 2016;*
- [62] Manuale UNICHIM 179/1, *"Valutazione della precision (ripetibilità) di un metodo analitico", 2001.*
- [63] ISS – Istituto Superiore di Sanità, dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Ambientale, *"Rapporti ISTISAN 16/39 – idoneità per lo scopo dei metodi analitici", Formazione e Informazione, Roma, Torino, 2014*
- [64] ALBERT, Richard; HORWITZ, William. A *heuristic derivation of the Horwitz curve. Analytical Chemistry, 1997, 69.4: 789-790.*

[65] Agilent Technologies, Inc., Claudimir Lucio do Lago, Daniela Daniel, "Determination of Haloacetic Acids in Drinking Water by LC/MS/MS", 2019.

