



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

**DETERMINAZIONE DI COMPOSTI ORGANOSTANNICI NEI SEDIMENTI E
NEL SUOLO MEDIANTE HS-SPME E GC-MS/MS**

Relatore: Prof. Luca Cappellin

Laureando: Davide Reiss Balbo
Matricola 2085354

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 I composti organostannici	1
1.2 Distribuzione nell'ambiente e tossicità	2
1.3 Quadro normativo italiano	2
1.4 Scopo della tesi.....	3
1.5 La tecnica SPME ^{[6][7]}	3
2. METODO DI PROVA	6
2.1 Campo di applicazione	6
2.2 Principio del metodo	7
2.3 Reagenti.....	8
2.4 Apparecchiature utilizzate.....	8
2.5 Materiali di riferimento e soluzioni.....	9
2.6 Condizioni strumentali	10
2.7 Taratura	12
2.8 Pre-trattamento e conservazione dei campioni.....	13
2.9 Analisi dei campioni.....	13
2.10 Controlli di qualità	13
2.11 Calcoli	14
2.12 Incertezza di misura	15
3. DISCUSSIONE DEI RISULTATI	16
3.1 Risultati della taratura strumentale.....	16
3.2 Calcolo del LOQ con il metodo di Currie ^[11]	17
3.3 Verifica dell'esattezza del metodo mediante analisi di un materiale a concentrazione nota ..	18
4. CONCLUSIONI	19
5. BIBLIOGRAFIA	20

1. INTRODUZIONE

1.1 I composti organostannici

I composti organostannici, d'ora in poi OTC, sono un gruppo di composti organometallici costituiti da un atomo di Stagno legato covalentemente ad un numero da 1 a 4 di sostituenti, solitamente alchilici o arilici.

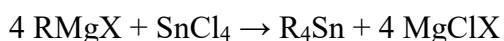
La formula chimica di questi composti può essere riassunta come R_nSnX_{4-n} dove R è il sostituente alchilico/arilico e X è l'anione, ipotizzato come monovalente.

Se il numero di sostituenti è inferiore a 4 il composto si presenta come un catione, il suo anione associato è variabile e dipende dall'intorno chimico; i più comuni sono cloruro, carbonato e idrossido. Il comportamento di questi composti è eterogeneo, le variabilità principali riguardano la solubilità in acqua e la volatilità. Anche l'efficacia come biocida è molto variabile e in genere è massima per i composti con formula R_3SnX , il cui rappresentante più importante è il tributilstagno TBT. Le caratteristiche chimico-fisiche differiscono notevolmente se si confronta un catione con un composto tetrasostituito, ma anche fra gli stessi cationi il numero e la tipologia dei sostituenti definiscono le proprietà del composto.^[1]

La produzione industriale degli OTC è iniziata dopo il 1940 in seguito alla scoperta delle loro proprietà come stabilizzanti termici e nei confronti della luce per il PVC, in particolare il mono e dibutilstagno. Il trifenilstagno e il tricicloesilstagno sono stati utilizzati come fitofarmaci in agricoltura.

La produzione mondiale supera le 50000 tonnellate l'anno e gli OTC prodotti negli ultimi decenni sono stati impiegati prevalentemente nelle vernici antivegetative per imbarcazioni e per la conservazione del legno; il composto largamente più utilizzato è il TBT.^[1]

La sintesi degli OTC può essere fatta alchilando completamente lo stagno con un reattivo di Grignard partendo da $SnCl_4$ ^[1]:



Dallo stagno tetrasostituito sono poi ottenuti i composti desiderati (mono-, di- o tri- sostituiti) tramite una successiva reazione di redistribuzione con altro $SnCl_4$.



Nell'utilizzo come antivegetativi nelle vernici gli OTC sono particolarmente performanti nell'evitare la proliferazione di alghe, piante o altri organismi acquatici sugli scafi delle imbarcazioni. La proliferazione di questi organismi fa diminuire in modo sostanziale l'idrodinamicità di un natante e si stima che grazie all'utilizzo di OTC, in particolare il TBT, negli ultimi decenni si sia risparmiato fino al 4% del carburante a livello mondiale per lo spostamento di navi; circa 7.3 milioni di tonnellate all'anno che corrispondono a circa 22 milioni di tonnellate di CO_2 .^[1]

1.2 Distribuzione nell'ambiente e tossicità

Gli OTC rilasciati gradualmente in ambiente acquatico, in particolare nei porti o altri luoghi di stazionamento delle navi, hanno un tempo di dimezzamento piuttosto basso se si considera la quantità dispersa in acqua, da 6 a 127 giorni in base alle condizioni. La loro persistenza nei sedimenti invece è nettamente maggiore e lo stesso per il suolo, il tempo di dimezzamento può arrivare fino a 9 anni.^[1] I composti più frequentemente rilevati sono il TBT e i suoi due prodotti di degradazione, dibutilstagno DBT e monobutilstagno MBT.

La contaminazione si può diffondere anche ad altre aree in seguito ad avvenimenti naturali che perturbano il fondale, oppure in caso di dragaggio e riutilizzo del sedimento altrove.

In seguito alla convenzione internazionale "Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships" del 2001, entrata in vigore nel 2008, gli OTC sono stati banditi dalle vernici antivegetative per le imbarcazioni; il divieto di utilizzare OTC è valido solo per i paesi che hanno ratificato l'accordo.

Per quanto riguarda la contaminazione da OTC nel suolo, questa dipende in larga parte dal loro utilizzo nell'industria del legno come additivo conservante o come fitofarmaco in agricoltura.

Gli OTC sono fra gli inquinanti più impattanti per un ambiente acquatico, l'accumulo di TBT avviene in molti organismi acquatici e per alcuni di questi è estremamente tossico anche a basse dosi.

Nei molluschi, in particolare quelli appartenenti alle classi Bivalvia e Gastropoda, il TBT causa malformazioni e altri danni all'apparato riproduttivo, ad esempio portando alla mascolinizzazione delle femmine di gasteropode e quindi al declino della popolazione in una determinata area soggetta a contaminazione.^[2]

Riguardo ai rischi per la salute umana, la via primaria di assunzione è l'alimentazione ed in particolare il consumo di prodotti ittici. Secondo alcuni studi nei mammiferi gli OTC sono interferenti endocrini e sono uno dei maggiori fattori di rischio per le funzioni riproduttive in entrambi i sessi, sono inoltre in grado di causare disfunzioni del sistema immunitario.^[2]

1.3 Quadro normativo italiano

Per i sedimenti ed i fanghi di dragaggio la normativa di riferimento in Italia è il Decreto 15 luglio 2016, n. 173^[3], in cui sono indicati i limiti massimi di concentrazione di 5 µg/kg s.s. per il solo TBT e 72 µg/kg s.s. per la somma di TBT, DBT e MBT. Il Decreto specifica anche un limite di quantificazione LOQ massimo di 1 µg/kg s.s. per MBT, DBT e TBT.

Nello stesso Decreto è indicato che «le metodologie analitiche impiegate per la determinazione dei parametri chimici devono essere metodiche normalizzate (es. UNI EN, ISO, USEPA), o riportate nei Manuali e Linee Guida ISPRA».

Con questa imposizione si presenta una evidente incongruenza fra i metodi richiesti e le effettive performance pretese dal legislatore, un fatto tutt'altro che isolato nella normativa italiana. Il metodo normalizzato più performante per la determinazione di OTC nei sedimenti è attualmente la norma UNI EN ISO 23161:2019^[4] che indica come limite di quantificazione di ogni singolo OTC 10 µg/kg, cioè 10 volte il LOQ richiesto dal Decreto e il doppio del limite di legge per il TBT.

Per quanto riguarda il suolo la normativa di riferimento è il Decreto Legislativo 152/06 Parte IV - Titolo V Allegato 5^[5] Tabella 1 colonna A (siti ad uso verde e residenziale), considerando le modifiche apportate dall'articolo 13 della Legge 11 agosto 2014, n. 116. Il limite di legge associato ai composti organostannici è 1 mg/kg s.s.

Come per tutti gli altri parametri da determinare nei terreni da bonifica il D.Lgs. 152/06 obbliga al raggiungimento di un LOQ di almeno 1/10 del limite massimo di concentrazione, ed è quindi richiesto un LOQ di 0.1 mg/kg s.s.

1.4 Scopo della tesi

Vista la similitudine fra le matrici sedimento e suolo e visto che il LOQ richiesto è decisamente inferiore per gli OTC nei sedimenti, la conformità normativa alla Tabella 2.4 del Decreto 15 luglio 2016, n. 173^[3] è sicuramente la sfida più interessante.

Il primo obiettivo di questa tesi è di colmare l'assenza di metodi analitici normalizzati in grado di determinare gli OTC nei sedimenti con un LOQ di 1 µg/kg s.s. per MBT, DBT e TBT, proponendo un metodo adatto allo scopo. Il metodo proposto dovrà essere oltre che tecnicamente adeguato, anche il più rapido e semplice possibile. Queste due caratteristiche solitamente non appartengono al classico approccio "estrazione con solvente > purificazione > concentrazione", che in molti casi è dispendioso in termini di tempo e manodopera.

Per quanto riguarda invece il limite nel suolo (1/10 del limite cioè 0.1 mg/kg s.s.) sarà sufficiente estendere il campo di applicazione del metodo a concentrazioni più elevate di quelle richieste dai sedimenti.

La tesi sarà sostanzialmente una procedura analitica da me sviluppata utilizzando come fonte principale il metodo di riferimento UNI EN ISO 23161:2019^[4], ottimizzato con tecniche strumentali alternative per ottenere i risultati sperimentali che riporterò nell'apposito capitolo.

Saranno riportate: l'impostazione del metodo a livello di procedura analitica, i dati prestazionali di taratura strumentale e i risultati dell'analisi di un materiale di riferimento a concentrazione nota.

La convalida di tutti i parametri prestazionali per un metodo normalizzato esula dallo scopo della tesi e potrebbe essere oggetto di futuri sviluppi.

Riassumendo i due obiettivi della tesi:

- 1) Proporre un metodo per la determinazione di OTC in grado di verificare la conformità dei sedimenti ai limiti normativi del Decreto 15 luglio 2016, n. 173^[3], quindi con un LOQ di 1 µg/kg s.s. per MBT, DBT e TBT.
- 2) Proporre un metodo migliorativo in termini di sensibilità analitica e di praticità rispetto al metodo di riferimento UNI EN ISO 23161:2019^[4].

1.5 La tecnica SPME^{[6][7]}

La microestrazione in fase solida (SPME) è una tecnica di estrazione che sfrutta una fase estraente montata su un supporto solido e posta in contatto con il campione in condizioni prestabilite.

Gli analiti contenuti nel campione si legano alla fase estraente fino al raggiungimento dell'equilibrio di ripartizione che dipenderà dalla concentrazione dell'analita, dalla sua affinità per la fase estraente e dalle condizioni analitiche in cui si trova il campione.

Generalmente si tratta di una fibra in silice che funge da supporto solido ed è rivestita dalla fase estraente per un centimetro di lunghezza e con spessore variabile. La fibra è parte di un ago in metallo montato su una siringa ed è retraibile all'interno dell'ago stesso.

Una volta che l'ago metallico ha forato il setto di un contenitore sigillato ermeticamente, la fibra è esposta al campione in condizioni di pH, temperatura, solvente, salinità e agitazione ben definite.

La costanza delle condizioni è necessaria per garantire la ripetibilità dell'estrazione. Infatti, a pari condizioni e a parità di fase estraente, il coefficiente di ripartizione sarà idealmente lo stesso e l'unica variabile che può influenzare la quantità estratta di un composto è la sua concentrazione.

Nel caso di campioni solidi la costanza delle condizioni è garantita trasferendo una porzione di estratto, derivante dalla prima estrazione diretta del campione, in una vial contenente un modificatore di matrice. Un modificatore di matrice è solitamente costituito da un tampone a pH e salinità costanti in soluzione acquosa.

Le fasi estraenti possono variare sia per la composizione che per lo spessore del film applicato alla fibra e si possono distinguere in due macrocategorie: assorbenti e adsorbenti.

Una fase assorbente è un film liquido molto viscoso che è in grado di solvatare in modo efficiente i composti per cui ha più affinità, cioè quelli con polarità simile; il composto assorbito è in grado di diffondere in tutto il volume della fase seguendo la legge di Fick. Queste fasi possono avere capacità di assorbimento molto elevata e gli analiti non competono fra loro non essendoci siti attivi, ma una vera fase liquida in cui diffondere. Nel caso delle fasi assorbenti, una volta superato il tempo necessario a raggiungere l'equilibrio di ripartizione, non ci sono idealmente variazioni nella concentrazione di analiti nella fibra.

Una fase adsorbente è invece una fase solida, solitamente cristallina, in grado di adsorbire all'interno dei pori molecole di dimensioni medio-piccole con interazioni di tipo di Van der Waals.

I siti attivi sono presenti in numero limitato e in molti casi le molecole possono entrare in competizione per la loro occupazione. Ad esempio le molecole di un composto adsorbite nei primi minuti possono essere rimpiazzate da molecole di altri composti all'aumentare del tempo di esposizione.

In entrambi le categorie di fase estraente una concentrazione di analiti troppo elevata porta alla saturazione e alla perdita della linearità del rapporto molecole assorbite/molecole totali nel campione.

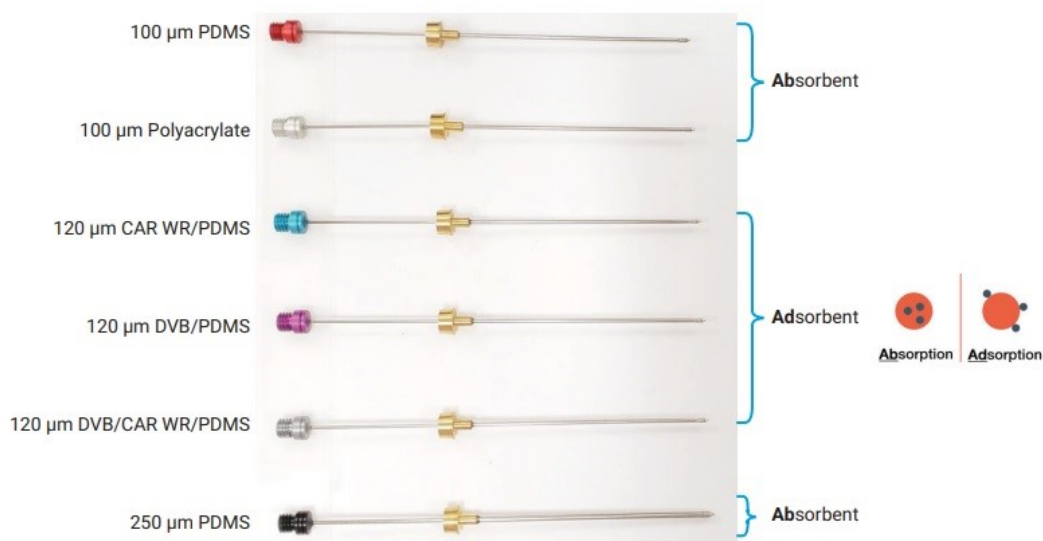


Figura 1: selezione materiali assorbenti e adsorbenti per SPME [6]

L'estrazione degli analiti dal campione può avvenire tramite estrazione diretta o estrazione dallo spazio di testa.

Nel caso dell'estrazione diretta la fibra è immersa direttamente nel campione liquido e in condizioni di agitazione il trasferimento avviene direttamente sulla fibra.

Per l'estrazione dallo spazio di testa la fibra è esposta al gas che sovrasta il liquido in una vial chiusa ermeticamente. Per poter assorbire gli analiti nella fase estraente è necessario che siano prima vaporizzati e che ci sia equilibrio fra le due fasi; è chiaro che se la polarità è simile i composti più volatili saranno assorbiti in quantità maggiore e saranno quindi determinabili con maggiore sensibilità.

Tipicamente l'estrazione diretta è eseguita nel caso di analiti particolarmente altobollenti, l'estrazione dallo spazio di testa è invece preferibile in tutti gli altri casi: l'immersione diretta della fibra in una matrice complessa riduce notevolmente la durata della fibra oltre ad aumentare le possibili interferenze presenti nella matrice derivanti da molecole ad alto peso molecolare, come acidi umidi o proteine.

L'efficienza di estrazione è solitamente inferiore nel caso dell'esposizione diretta nel liquido, l'estrazione degli analiti dipende dalla loro diffusione attraverso un sottile film di liquido adiacente alla fibra. Questo film è difficile da perturbare anche utilizzando una agitazione vigorosa, quindi nel caso dell'immersione diretta il tempo per raggiungere l'equilibrio è mediamente più elevato dello spazio di testa.

L'estrazione dello spazio di testa ha come altro vantaggio la possibilità di utilizzare modificatori di matrice, necessari per garantire la costanza delle condizioni (pH, salinità, solvente) anche fra campioni molto diversi, senza doversi preoccupare di danneggiare la fibra.

L'efficienza di estrazione dello spazio di testa per una fase assorbente dipende dalla formula^[7]:

$$n = \frac{C_0 K_1 K_2 V_1 V_2}{K_1 K_2 V_1 + K_2 V_2 + V_3}$$

dove:

- n sono le moli di analita assorbite dalla fibra
- C_0 è la concentrazione molare di analita nel liquido
- V_1 , V_2 e V_3 sono i volumi della fase estraente, del liquido e dello spazio di testa
- K_1 è il coefficiente di ripartizione fra fibra e spazio di testa
- K_2 è il coefficiente di ripartizione fra liquido e spazio di testa

Nel caso degli OTC in matrici complesse come i sedimenti o il suolo, l'estrazione SPME dello spazio di testa è l'approccio ideale per i motivi sopradescritti. Per rendere questa strada percorribile è necessario verificare che tutti gli analiti da determinare siano sufficientemente volatili; è dimostrato che gli OTC sono sufficientemente volatili da poter essere determinati con un gascromatografo una volta peralchilati con un opportuno reagente derivatizzante.^[4]

Resta quindi da confermare che alle condizioni in cui verrà eseguita la SPME un quantitativo sufficiente di OTC possa raggiungere la fase assorbente tramite lo spazio di testa.

Una volta che la fibra è stata esposta al campione per il tempo necessario al raggiungimento dell'equilibrio di ripartizione, viene rimossa dalla vial di estrazione ed è pronta per il desorbimento nello strumento di analisi, in questo caso un GC-MS/MS.

L'iniettore di un gascromatografo si trova in genere termostato ad una temperatura variabile tra 200°C e 300°C e con un flusso di gas costante, esponendo la fibra nell'iniettore a queste temperature i composti assorbiti nella fase estraente sono trasferiti nella fase gas e quindi portati in colonna. La

rimozione continua degli analiti appena vaporizzati da parte del gas permette il loro trasferimento quantitativo e questo procedimento è favorito con un liner di diametro interno poco superiore al diametro della fibra; la fase estraente della fibra dopo il desorbimento è pronta per una successiva estrazione.



Figura 2: fase di desorbimento nell'iniettore

Un vantaggio di questa tecnica rispetto al classico metodo estrazione > purificazione > concentrazione, che è anche quello proposto dal metodo di riferimento UNI EN ISO 23161:2019^[4], è la praticità e la minore manipolazione a cui è sottoposto il campione, in particolare se si considera l'implementazione di questo metodo con un sistema automatizzato. Esistono autocampionatori in grado di eseguire interamente l'analisi in automatico: estrazione con agitazione in ambiente termostato, iniezione, ricondizionamento della fibra e in alcuni casi è automatizzabile anche la fase di derivatizzazione.

Un altro vantaggio è la migliore sensibilità, nel caso di composti sufficientemente volatili è possibile assorbire una quantità significativa di analita senza dover gestire la matrice.

Un ultimo aspetto riguarda il significativo risparmio di solvente che altrimenti dovrebbe essere utilizzato per l'estrazione e per le fasi di purificazione.

2. METODO DI PROVA

2.1 Campo di applicazione

Il metodo proposto in questa tesi è utilizzabile per la determinazione di composti organostannici in sedimenti, suolo e rifiuti (di tipologia terra e rocce). Il range di concentrazione è indicativamente da 1 a 500 µg/kg s.s. per i composti in Tabella 1. Il limite di concentrazione superiore non è vincolante perché è legato al fattore di diluizione dell'estratto e alla pesata iniziale di campione, concentrazioni più elevate possono essere determinate diluendo maggiormente l'estratto.

Adeguando le condizioni analitiche è possibile determinare altri OTC oltre a quelli in Tabella 1.

$R_nSn^{(4-n)+}$	R	n	nome composto	acronimo
$BuSn^{3+}$	Butile	1	Monobutilstagno catione	MBT
Bu_2Sn^{2+}	Butile	2	Dibutilstagno catione	DBT
Bu_3Sn^+	Butile	3	Tributilstagno catione	TBT
$OcSn^{3+}$	Ottile	1	Monoottilstagno catione	MOT
Oc_2Sn^{2+}	Ottile	2	Diottilstagno catione	DOT
Cy_3Sn^+	Cicloesile	3	Tricicloesilstagno catione	TCyT
Bu_4Sn	Butile	4	Tetrabutylstagno	TTBT

Tabella 1 Elenco dei composti determinabili col metodo

2.2 Principio del metodo

Gli OTC naturalmente peralchilati (come il TTBT), a differenza degli OTC cationi, sono relativamente volatili e per questo motivo la loro determinazione non può essere eseguita su un campione preventivamente essiccato a 105°C. [4]

Per non dover eseguire due estrazioni separate, sia i cationi che il TTBT sono determinati con una unica estrazione a partire dal campione essiccato a 40°C, tradizionalmente chiamato “secco all’aria”. Su una porzione del secco all’aria si determina a parte la % di Umidità residua a 105°C, così da poter calcolare le concentrazioni degli OTC riferite alla sostanza secca per il confronto coi limiti normativi. Per ogni campione, bianco procedurale o controllo è aggiunta, prima dell’estrazione, una soluzione di standard interni ISTD. La soluzione contiene uno standard interno per ogni grado di alchilazione (4 composti in tutto) e servirà a correggere il risultato di ogni OTC per le perdite eventualmente dovute a effetto matrice, siti attivi nei vari componenti, efficienza di estrazione e desorbimento o variazione delle condizioni dello spettrometro di massa.

L’estrazione degli OTC dalla porzione di campione avviene con l’utilizzo di una soluzione alcolica basica mediante agitazione meccanica o con un bagno a ultrasuoni. [4]

Un volume noto dell’estratto è poi trasferito in una vial e addizionato di una soluzione Buffer di tampone acetico (modificatore di matrice) e dell’agente derivatizzante. Gli OTC cationi sono determinabili previa derivatizzazione con un agente alchilante in modo da renderli peralchilati e volatili; il TTBT è determinato tal quale.

La vial è quindi termostata e posta in agitazione per garantire la riproducibilità delle condizioni per tutti i campioni.

Raggiunto l’equilibrio di ripartizione degli OTC tra fase liquida e fase gassosa, una fibra SPME rivestita con la fase assorbente PDMS (polidimetilsilossano) è inserita nella porzione di spazio di testa della vial attraverso il setto ed è mantenuta esposta al campione per un tempo prestabilito. Gli analiti sono assorbiti dalla fase estraente della fibra che è successivamente rimossa per essere trasferita nell’iniettore del gascromatografo.

Nell’iniettore, che si trova a temperatura elevata, avviene il desorbimento degli analiti che passano quantitativamente dalla fase estraente alla fase gas per essere trasferiti alla colonna capillare. La colonna capillare separa i composti in base alla loro temperatura di ebollizione e affinità per la fase stazionaria prima di raggiungere il detector, che è uno spettrometro di massa triplo quadrupolo.

Gli analiti, idealmente (ma non necessariamente) separati cromatograficamente, raggiungono la sorgente di ioni dello spettrometro di massa, qui una parte delle molecole in ingresso è ionizzata con

impatto elettronico a 70 eV ed i frammenti prodotti (cationi monovalenti) entrano nel primo quadrupolo Q1 e sono separati per massa.

Alcuni ioni prescelti in uscita da Q1 (parent ion) subiscono una seconda frammentazione nella camera di collisione con azoto; gli ioni prodotti (product ion) sono separati da un secondo quadrupolo Q2 e arrivano al detector.

Una volta identificato il tempo di ritenzione di ogni analita, la quantificazione è eseguita in modalità MRM (multiple reaction monitoring) e per ogni OTC sono monitorate due transizioni caratteristiche, una di quantificazione e una di qualifica.

La completa separazione cromatografica non è necessaria perché gli analiti non sono isomeri e quindi, anche se coeluenti, sono facilmente discriminabili per massa non avendo transizioni condivise.

2.3 Reagenti

nome	caratteristiche minime di qualità
sodio tetraetilborato	grado analitico (ACS, RPE)
acqua	ISO 3696 Grado 3
acetato di sodio	grado analitico (ACS, RPE)
acido acetico glaciale	grado analitico (ACS, RPE)
idrossido di sodio	grado analitico (ACS, RPE)
metanolo	grado analitico (ACS, RPE)
elio	grado 5.5 ($\geq 99.9995\%$)
azoto	grado 5.5 ($\geq 99.9995\%$)

Tabella 2 Reagenti utilizzati

- Soluzione di NaOH in metanolo 10% m/v: la dissoluzione è facilitata con bagno ad ultrasuoni.
- Soluzione tampone acetato a pH 5.3 0.2 M: circa 13.246 g di acetato di sodio anidro e circa 2.314 g di acido acetico glaciale, volume finale 1 L con acqua deionizzata.
- Soluzione derivatizzante di sodio tetraetilborato 1% m/v in acqua: la soluzione è preparata fresca per ogni giorno di analisi in base al numero di campioni da processare, considerando che ogni campione, bianco e controllo necessita di 1 mL di soluzione.

N.B. Il sodio tetraetilborato esposto all'aria si scalda rapidamente e inizia a fondere, prendendo spontaneamente fuoco in poco tempo (osservati ~2 minuti per una porzione di 100 mg), la pesata è da eseguire rapidamente ed al termine è necessario bagnare con acqua ogni oggetto che vi è entrato in contatto; non usare carta o tessuti asciutti per la pulizia e chiudere il contenitore del prodotto il prima possibile.

2.4 Apparecchiature utilizzate

- Bilancia (unità formato 1 mg)
- Vetreria da laboratorio (pipette, matracci, etc.)
- Siringhe in vetro (tipo Hamilton/SGE) da 10 μ L, 250 μ L, 1 mL.
- Stufa a convezione (tarata a 40°C e 105°C)
- Frigorifero (tarato nel range 4-8 °C)
- Freezer ($T \leq -18^\circ\text{C}$)
- Vial da 10 mL con tappo a vite
- Vial da 20 mL per spazio di testa (crimp) con tappo ermetico e setto in teflon

- Bagno termostato a 45°C con agitazione magnetica
- Bagno a ultrasuoni
- Termometro
- Cronometro
- Kit manuale per SPME (Agilent 5191-5877)
- GC-MS/MS triplo quadrupolo (Agilent 7890A + 7000C), sorgente EI 70 eV (Agilent XTR G2591C), iniettore split/splitless, liner per iniezione SPME (Restek Topaz cod. 23313), colonna capillare 60 m, 0.25 mm I.D., 0.25 µm film (J&W DB5ms UI)
- Fibra SPME in polidimetilsilossano PDMS 30 µm (Supelco cod.57289).

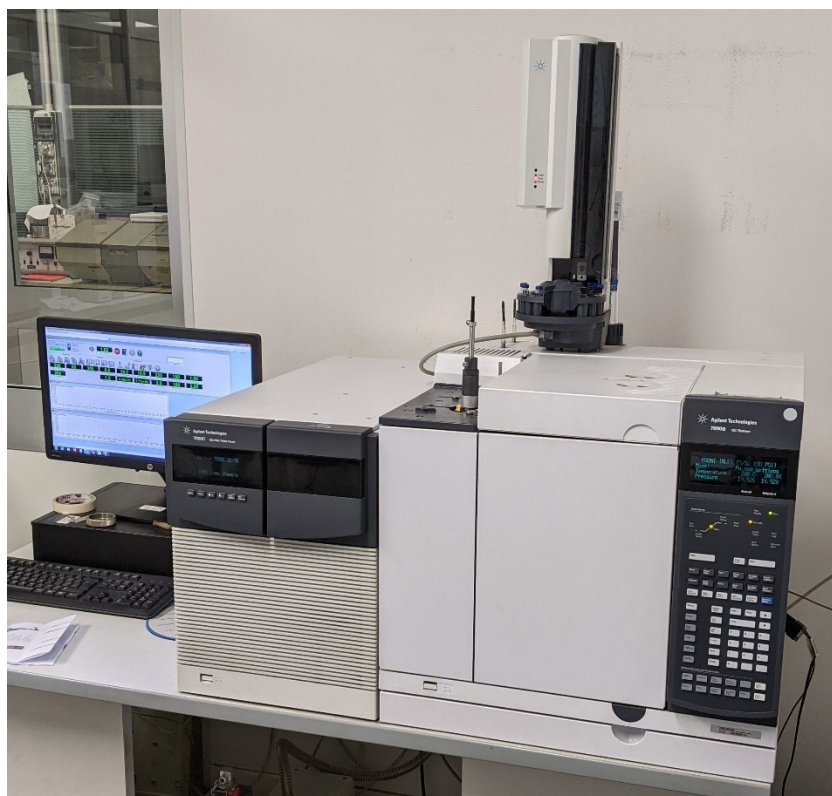


Figura 3: GC-MS/MS triplo quadrupolo Agilent 5890+7000C con kit manuale SPME Agilent 5191-5877

2.5 Materiali di riferimento e soluzioni

I materiali di riferimento sono dotati di certificato di conformità a ISO 17034 ed è utilizzata la data di scadenza indicata del produttore. Le soluzioni diluite in metanolo riportate in Tabella 4 si sono dimostrate stabili per 6 mesi se conservate al buio in freezer a -18°C in vial chiuse ermeticamente, in accordo con quanto indicato in Appendice A2 di UNI EN ISO 23161:2019^[4]; non è stato possibile valutare tempi di conservazione maggiori.

L'anione associato ai cationi OTC è variabile e scambiabile in base all'intorno chimico, oltre che irrilevante, la taratura è stata eseguita considerando la concentrazione effettiva di OTC catione e non quella nominale di sale cloruro.

Le soluzioni utilizzate sono ITA-30 (lot. 6752265) e ITA-32 (lot. 6758515) di UltraScientific, che per i lotti forniti dichiara le seguenti concentrazioni:

Nome	CAS	Conc. composto	%OTC*	Conc. OTC
Soluzione stock Mix di OTC in metanolo ITA-30				
Monobutilstagno tricloruro	1118-46-3	1003 mg/L	62.3	624.9 mg/L
Dibutilstagno dicloruro	683-18-1	1003 mg/L	76.7	769.3 mg/L
Tributilstagno cloruro	1461-22-9	1000 mg/L	89.1	891.0 mg/L
Tetrabutylstagno	1461-25-2	1003 mg/L	100	1003 mg/L
Monoottilstagno tricloruro	3091-25-6	1004 mg/L	68.6	688.7 mg/L
Diottilstagno dicloruro	3542-36-7	1005 mg/L	83.0	834.2 mg/L
Tricicloesilstagno cloruro	3091-32-5	1003 mg/L	91.2	914.7 mg/L
Soluzione stock di standard interni in metanolo ITA-32				
Monoepilstagno tricloruro	59344-47-7	1001 mg/L	67.2	672.7 mg/L
Diepilstagno dicloruro	74340-12-8	1000 mg/L	81.7	817.0 mg/L
Tripopilstagno cloruro	2279-76-7	1003 mg/L	87.5	877.6 mg/L
Tetrapopilstagno	2176-98-9	1002 mg/L	100	1002 mg/L

Tabella 3: materiali di riferimento

$$* \%OTC = \frac{\text{massa catione}}{\text{massa composto}} * 100$$

Nome soluzione	Concentrazione nominale (µg/L)	Pipetta utilizzata (mL)	Matraccio utilizzato (mL)	Soluzione da cui partire
STD6	10000	1	100	Stock
STD5	5000	5	10	STD6
STD4	1000	2	10	STD5
STD3	250	2,5	10	STD4
STD2	50	2	10	STD3
STD1	10	2	10	STD2

Tabella 4: schema diluizioni per le soluzioni di taratura

Soluzione ISTD Spike: la soluzione stock di standard interni è stata diluita 1 a 100 con metanolo per ottenere una soluzione intermedia a 10000 µg/L. Diluendo questa soluzione 1:20 in metanolo è stata ottenuta la soluzione ISTD spike a 500 µg/L.

2.6 Condizioni strumentali

Condizioni di estrazione SPME per campioni, standard, bianchi, controlli

- Pre-equilibrio: 10-15 minuti in agitazione a 500 rpm e 45°C.
- Estrazione: 30 minuti in agitazione a 500 rpm a 45°C con i 10 mm terminali della fibra PDMS 30 µm interamente esposti al solo spazio di testa.

Condizioni strumentali del GC-MS/MS

- Iniettore: 280°C, splitless pulsato a 60 psi per 0.7 min, poi purge 50 mL/min.
- Tempo di desorbimento e ricondizionamento della fibra direttamente nell'iniettore: 3 min.
- Carrier: elio, flusso costante 1.2 mL/min.
- Forno: 50°C per 1 min., fino a 300 °C a 10°C/min, 300°C per 4 min. (30 min totali).

- Transfer line: 300°C.
- Sorgente: 250°C, Q1 e Q2 180°C, EI 70 eV, solvent delay 10 min.
- Modalità MRM: gas di collisione Azoto e condizioni come in Tabella 5

Segmento MRM	Composto*	RT (minuti)	Parent ion (m/z)	Product ion (m/z)	Dwell time (ms)	Collision energy (eV)
1	Monobutilstagno	13.519	179	151	60	5
	Monobutilstagno	13.519	179	123	60	10
	Tripopilstagno	14.439	193	151	40	5
	Tripopilstagno	14.439	193	123	40	10
	Tetrapopilstagno	15.395	207	165	40	5
	Tetrapopilstagno	15.395	207	123	40	10
	Dibutilstagno	15.723	179	151	60	5
	Dibutilstagno	15.723	263	207	60	5
2	Monoetilstagno	17.450	179	123	30	10
	Monoetilstagno	17.450	179	151	30	5
	Tributilstagno	17.622	207	123	60	15
	Tributilstagno	17.622	291	179	60	10
	Monoottilstagno	18.680	179	123	50	10
	Monoottilstagno	18.680	179	151	50	5
	Tetrabutylstagno	19.227	291	179	50	10
	Tetrabutylstagno	19.227	235	179	50	5
3	Dieptilstagno	22.227	249	151	30	5
	Dieptilstagno	22.227	249	123	30	15
	Diottilstagno	24.092	263	151	50	5
	Diottilstagno	24.092	263	123	50	15
	Tricicloesilstagno	26.300	233	151	50	5
	Tricicloesilstagno	26.300	233	123	50	15

Tabella 5: condizioni strumentali per MRM (*i cationi sono intesi come peretilati)

Le condizioni strumentali sopradescritte derivano dall'ottimizzazione in seguito a diverse prove eseguite su uno standard a concentrazione medio-alta (STD5).

I tempi di ritenzione sono stati acquisiti iniettando STD5 in Full scan e riconoscendo i composti con libreria NIST14.

I parent ion sono stati scelti fra gli ioni più abbondanti/caratteristici di ogni OTC.

I product ion sono i picchi più abbondanti rilevati in full scan col secondo quadrupolo in seguito a frammentazione del parent ion in camera di collisione (modalità "product ion" con software Masshunter).

I dwell time dei composti in taratura sono elevati per migliorare la sensibilità a basse concentrazioni, è stato possibile mantenere più bassi i dwell time degli standard interni essendo presenti a concentrazione elevata e costante.

L'obiettivo era quello di ottenere un cycle time di almeno 2.5 Hz per ogni segmento MRM, ed è stato raggiunto. La larghezza alla base dei picchi del primo punto di taratura è di circa 5 secondi; quindi

nello scenario peggiore il picco è costituito da 12-13 punti che garantiscono una buona ripetibilità; è generalmente accettabile un minimo di 10 punti per picco.^[8]

2.7 Taratura

La taratura è stata eseguita con standard interno e per ogni analita è stato calcolato il fattore di risposta RF^[9] per ogni livello di concentrazione:

$$RF = \frac{\text{Area OTC} \times \text{ng IS}}{\text{Area IS} \times \text{ng OTC}}$$

Per i cationi sono stati utilizzati i ng riferiti al catione, non al sale cloruro o al composto etilato.

Gli standard interni sono 4 e ad ogni OTC è stato assegnato uno standard interno secondo questo criterio:

- se l'OTC è un catione monoalchilato il suo standard interno dovrebbe essere monoalchilato, il passaggio critico in questo caso è la completa alchilazione dell'analita che deve subire tre alchilazioni.^[4]
- se l'OTC non è monoalchilato il suo standard interno dovrebbe essere quello col tempo di ritenzione più simile fra quelli disponibili.

In una vial in vetro per spazio di testa da 20 mL sono stati aggiunti 9 mL di soluzione tampone acetato a pH 5.3, 10 µL di soluzione ISTD spike e 10 µL della rispettiva soluzione standard di taratura.

Dopo aver chiuso ermeticamente la vial con un tappo con setto in PTFE è stato aggiunto, forando il setto con la siringa, 1 mL di soluzione acquosa di NaBEt₄ 1% m/v; l'aggiunta è stata fatta con la punta dell'ago della siringa immerso nel liquido. Le 6 vial sono state processate come descritto al paragrafo 2.6 per l'acquisizione dei relativi cromatogrammi.

Utilizzando le soluzioni preparate come in Tabella 4, i 6 livelli di concentrazione della retta di taratura hanno le seguenti quantità di OTC espresse in ng assoluti nella vial di estrazione:

Nome	STD6 (ng)	STD5 (ng)	STD4 (ng)	STD3 (ng)	STD2 (ng)	STD1 (ng)
Monobutilstagno	62.487	31.24	6.25	1.5622	0.3124	0.0625
Dibutilstagno	76.930	38.47	7.69	1.9233	0.3847	0.0769
Tributilstagno	89.100	44.55	8.91	2.2275	0.4455	0.0891
Tetrabutilstagno	100.300	50.15	10.03	2.5075	0.5015	0.1003
Monoottilstagno	68.874	34.44	6.89	1.7219	0.3444	0.0689
Diottilstagno	83.415	41.71	8.34	2.0854	0.4171	0.0834
Tricicloesilstagno	91.474	45.74	9.15	2.2868	0.4574	0.0915
Standard interni						
Monoetilstagno	3.363	3.363	3.363	3.363	3.363	3.363
Dieptilstagno	4.085	4.085	4.085	4.085	4.085	4.085
Tripropilstagno	4.388	4.388	4.388	4.388	4.388	4.388
Tetrapropilstagno	5.010	5.010	5.010	5.010	5.010	5.010

Tabella 6: composizione delle soluzioni di taratura

La taratura è accettabile se la deviazione standard relativa dei fattori di risposta (RF RSD) è $\leq 30\%$ come indicato al paragrafo 11.5.4.2 di EPA 8000D^[9]; come dimostrato al capitolo 3 questo criterio è stato rispettato e quindi per la quantificazione dei composti è stato utilizzato l'RF medio dei livelli di concentrazione.

In alternativa è possibile utilizzare la retta di taratura con regressione lineare con metodo dei minimi quadrati, in tal caso il criterio di accettabilità è $R^2 > 0.99$ ^[9]; anche questo criterio è stato rispettato per tutti i composti.

La taratura è valida finché è garantito il superamento del CCV (continuing calibration verification) eseguito come descritto al paragrafo 2.10.

2.8 Pre-trattamento e conservazione dei campioni

Conservazione dei campioni^[4]:

Se l'analisi è eseguita entro 7 giorni dal prelievo conservare in frigorifero (4-8°C).

Se l'analisi è eseguita oltre i 7 giorni dal prelievo conservare in freezer a $T \leq -18^\circ\text{C}$.

Pre-trattamento dei sedimenti: essiccare il campione a 40 °C per ottenere il “secco all'aria” e dopo omogeneizzazione determinare l'umidità residua a 105°C con D.M. 13/09/1999^[10] metodo II.2. L'analisi per gli OTC è da eseguire sul sedimento essiccato a 40°C.

Pre-trattamento del suolo: come richiesto dal D.Lgs. 152/06^[5] rimuovere in campo i materiali di dimensioni maggiori di 2 cm. Essiccare il campione a 40 °C e determinare la terra fine (frazione minore di 2 mm) e lo scheletro (frazione maggiore di 2 mm) con D.M. 13/09/1999^[10] metodo II.1. Determinare sulla terra fine l'umidità residua a 105°C con D.M. 13/09/1999^[10] metodo II.2. L'analisi per gli OTC è da eseguire sulla terra fine essiccata a 40°C.

2.9 Analisi dei campioni

In una vial in vetro da 10 mL pesare esattamente circa 0.8-1.2 g di campione omogeneizzato e opportunamente trattato come descritto al paragrafo 2.8.

Aggiungere 10 mL della soluzione di NaOH al 10% in metanolo e 100 μL di soluzione ISTD spike; la vial ben tappata è posta in un bagno a ultrasuoni per almeno 45 minuti a temperatura ambiente.

Al termine dell'estrazione non centrifugare l'estratto e non lasciar decantare il solido.

Agitare manualmente la vial di estrazione e trasferire rapidamente 1 mL di sospensione in una vial in vetro da 20 mL per spazio di testa. Alla vial per spazio di testa aggiungere 8 mL di soluzione di tampone acetato a pH 5.3 ed un'ancoretta magnetica.

Chiudere la vial ermeticamente con un tappo con setto in PTFE e, forando il setto con una siringa, iniettare 1 mL di soluzione acquosa di NaBEt₄ 1% m/v; l'aggiunta va fatta con la punta dell'ago della siringa immerso nel liquido.

Le condizioni per l'estrazione SPME e per la determinazione con GC/MS sono le stesse del paragrafo 2.6.

2.10 Controlli di qualità

Continuing calibration verification CCV^[8]: preparare una vial per estrazione SPME con 9 mL di tampone acetato a pH 5.3, 10 μL di soluzione ISTD spike, 10 μL di una soluzione di taratura intermedia (es. STD4) e 1 mL di soluzione derivatizzante. Processare come descritto al paragrafo 2.6.

Bianco procedurale MB^[8]: eseguire l'intera procedura descritta al paragrafo 2.9 ma utilizzando una matrice pulita (es. sabbia di Ottawa) invece del campione.

Rapporto Quantificatore/Qualificatore^[8]: per tutti i composti rilevati in concentrazione superiore a LOQ è possibile calcolare il rapporto fra l'intensità della massa di quantificazione e quella di qualifica. Il confronto è fatto usando come riferimento il rapporto medio degli standard di taratura. Serve a confermare che il composto quantificato con un determinato RT sia effettivamente quello ricercato e non un interferente.

Tempo di ritenzione: il tempo di ritenzione RT di ogni composto nel campione deve essere entro ± 10 secondi rispetto al RT dello stesso composto in una corsa di riferimento, ad esempio quello osservato nel CCV.

Se si verifica uno spostamento che interessa tutti i composti significa che sono variate alcune condizioni strumentali oppure che la colonna sta perdendo fase stazionaria durante il suo normale invecchiamento, anticipando l'eluizione di tutti gli analiti. È possibile riottenere gli RT di riferimento fissandoli su un composto con eluizione intermedia, ad esempio Tetrabutilstagno, tramite la funzione RT Lock (su Masshunter).

Tune evaluation^[8]: prima di ogni batch è necessario verificare le buone condizioni dello spettrometro di massa. In genere è eseguibile una valutazione automatica del tune con un gas di calibrazione che include un confronto con i range di accettabilità del costruttore. Ogni parametro verificato deve superare i requisiti minimi del costruttore (voltage elettromoltiplicatore, corrente di fondo, quantità di aria e acqua, rapporti fra masse del gas di calibrazione, etc).

controllo qualità	criterio accettabilità^[8]	frequenza
CCV	$\pm 20\%$ conc. nominale soluzione	per ogni batch giornaliero
MB	$\leq 1/2$ di LOQ	per ogni batch giornaliero
Rapporto Quant/Qual	$\pm 30\%$ rispetto al rapporto di riferimento medio in taratura	per ogni analita > LOQ
RT	± 10 secondi rispetto a RT di riferimento	per ogni analita > LOQ
Tune evaluation con PFTBA	come da specifiche costruttore	prima di ogni batch

Tabella 7: criteri di accettabilità dei controlli di qualità

2.11 Calcoli

La taratura strumentale eseguita come descritto al paragrafo 2.7 fornisce i risultati in ng assoluti di ogni OTC nella vial per SPME. La quantità presente in questa vial è 1/10 di quella totale dell'estratto nella prima fase per via della diluizione intermedia. Avendo a disposizione il dato dell'umidità residua a 105°C determinato sul secco a 40°C il calcolo del risultato finale è:

$$\mu\text{g/kg s.s. di OTC} = \frac{\text{ng OTC} * 10 * 100}{\text{g campione} * (100 - \text{umidità}\%)}$$

2.12 Incertezza di misura

L'incertezza di misura non è stata stimata al momento della presentazione di questa tesi, tuttavia è possibile identificare i contributi principali all'incertezza per una successiva stima.

Contributi di tipo A: incertezza di ripetibilità calcolata con almeno 12 prove ripetute su almeno 2 livelli di concentrazione. Idealmente l'incertezza andrebbe stimata in prossimità dei limiti di legge verso i quali verrà applicata una regola decisionale per la conformità, quindi 5 µg/kg s.s e 1000 µg/kg s.s. per ogni OTC.

Contributi di tipo B:

- incertezza derivante dalle diluizioni per la preparazione delle soluzioni di taratura, quindi l'incertezza delle pipette e dei matracci
- incertezza della bilancia utilizzata per pesare ~1 g di campione
- incertezza dei due materiali di riferimento, cioè soluzione Stock e soluzione di standard interni, ottenibile dal loro certificato
- incertezza derivante dalla taratura. In questo caso, visto che si utilizza un criterio di accettabilità della taratura di $\pm 20\%$, è ragionevole applicare il criterio di accettabilità come incertezza di taratura (incertezza relativa di taratura = $0.2/\sqrt{3}$ essendo un criterio stabilito a priori).
- l'incertezza derivante dalla determinazione dell'umidità residua %.

Dalle prove di ripetibilità eseguite su campioni a concentrazione nota è possibile verificare l'esattezza del metodo per ogni OTC. Eseguire il t test per ogni analita, se il test non è superato ed è confermato un errore sistematico, sarà necessario applicare un fattore di recupero. All'incertezza composta applicare un fattore di copertura $k=2$ per ottenere l'incertezza estesa, per un livello di probabilità $p=95\%$.

Agricultural soil															
Compound	ISO 5725-2								DIN 38402-45:2003-09					Reference value ng/g	
	<i>l</i>	<i>n</i>	<i>o</i> %	$\bar{\bar{x}}$ ng/g	s_R ng/g	η %	$C_{V,r}$ %	$C_{V,R}$ %	<i>l</i>	$\bar{\bar{x}}$ ng/g	s_R ng/g	η %	$C_{V,r}$ %		$C_{V,R}$ %
MBT	8	20	10,0	32,61	6,00	97,59	7,32	17,96	12	36,57	13,70	109,46	4,87	41,00	33,41
DBT	10	25	4,0	37,27	8,10	94,72	8,13	20,59	13	36,08	7,07	91,68	7,40	17,97	39,352
TBT	10	26	0,0	20,62	2,68	97,11	9,74	12,60	13	20,73	3,33	97,65	8,55	15,66	21,232
TTBT	9	22	0,0	36,46	5,04	89,70	4,82	12,40	12	38,00	10,03	93,49	6,64	24,68	40,648
MOT	6	16	6,3	29,73	8,41	94,56	14,26	26,76	10	48,43	24,75	154,05	6,67	78,73	31,438
DOT	7	18	0,0	31,97	6,48	77,75	4,69	15,77	10	38,76	15,23	94,26	6,37	37,04	41,116
TPhT	10	26	0,0	27,48	14,33	56,50	12,60	29,47	13	28,38	16,04	58,35	5,78	32,99	48,631
TCyT	6	14	7,1	20,30	7,16	65,53	2,90	23,13	10	28,50	20,79	92,01	4,74	67,11	30,979

l number of laboratories.
n number of results used for data evaluation.
o percentage of outliers.
 $\bar{\bar{x}}$ overall mean of results.
 s_R reproducibility standard deviation.
 η recovery rate (mean value $\bar{\bar{x}}$ /reference value).
 $C_{V,r}$ coefficient of variation of repeatability.
 $C_{V,R}$ coefficient of variation of reproducibility.

Figura 4: dati prestazionali per l'analisi di OTC nel suolo ad uso agricolo^[4]

Non esistono metodi normati che utilizzino la tecnica SPME per la determinazione di OTC, ma i dati prestazionali ottenuti possono comunque essere confrontati con quelli del metodo di riferimento UNI EN ISO 23161:2019^[4] riportati in Figura 4.

3. DISCUSSIONE DEI RISULTATI

3.1 Risultati della taratura strumentale

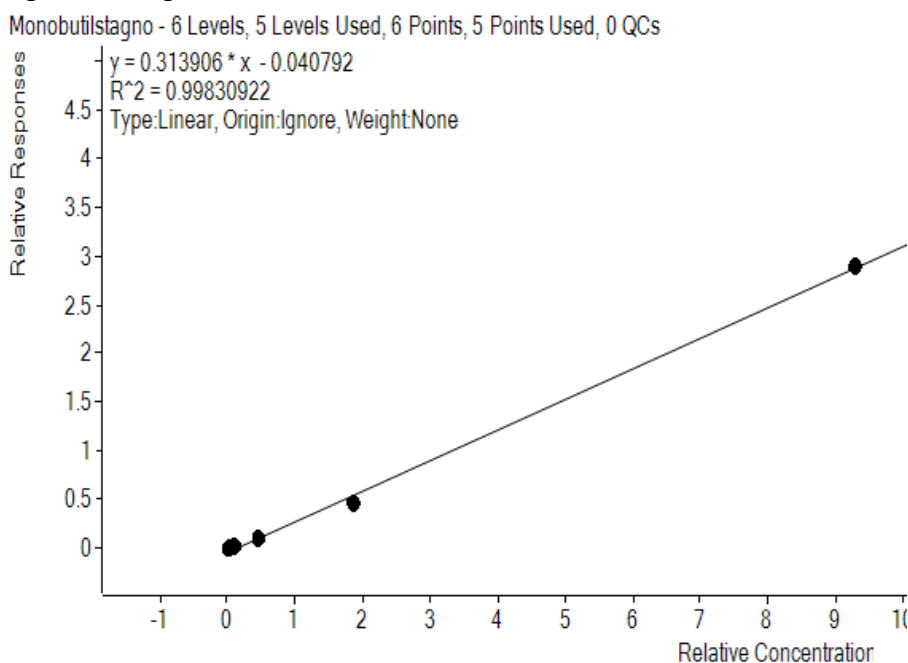
Il metodo scelto per la taratura è quello del fattore di risposta medio, in Tabella 8 sono riportati i fattori di risposta per tutti i composti e per tutti i livelli di concentrazione insieme all'RF medio; è riportata inoltre la loro deviazione standard relativa % (che è accettabile fino ad un massimo di 30%)^[9].

In corsivo sono indicati gli RF che sono risultati anomali con almeno uno fra i test di Huber, Grubbs e Dixon; non sono utilizzati per il calcolo dell'RF medio e di RF RSD. EPA 8000D^[9] richiede almeno 5 livelli di concentrazione per poter usare l'RF medio, essendo questo requisito soddisfatto anche in seguito all'eliminazione degli RF anomali non è stato necessario ripetere l'analisi degli standard.

	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	RF medio	RF RSD%
MBT	0.3600	0.2617	<i>0.2029</i>	0.2469	0.3113	0.2516	0.2863	16.9
DBT	1.6992	1.4944	1.3737	1.9517	2.2260	2.5107	1.8760	23.4
TBT	2.9516	3.1162	4.2951	2.7506	3.2501	<i>5.6540</i>	3.2727	18.4
TTBT	3.1277	3.1586	1.9122	2.9754	3.4126	<i>6.0847</i>	2.9173	19.9
MOT	1.4744	<i>0.7394</i>	1.0910	0.7973	0.9015	1.0005	0.9060	15.9
DOT	0.2623	0.1869	<i>0.4338</i>	0.2405	0.3034	0.2841	0.2554	17.6
TCyT	0.2699	0.1671	0.3322	<i>0.1563</i>	0.1987	0.1936	0.2323	29.0

Tabella 8: riepilogo fattori di risposta

A titolo di esempio sono riportate le rette di MBT, DBT e TBT:



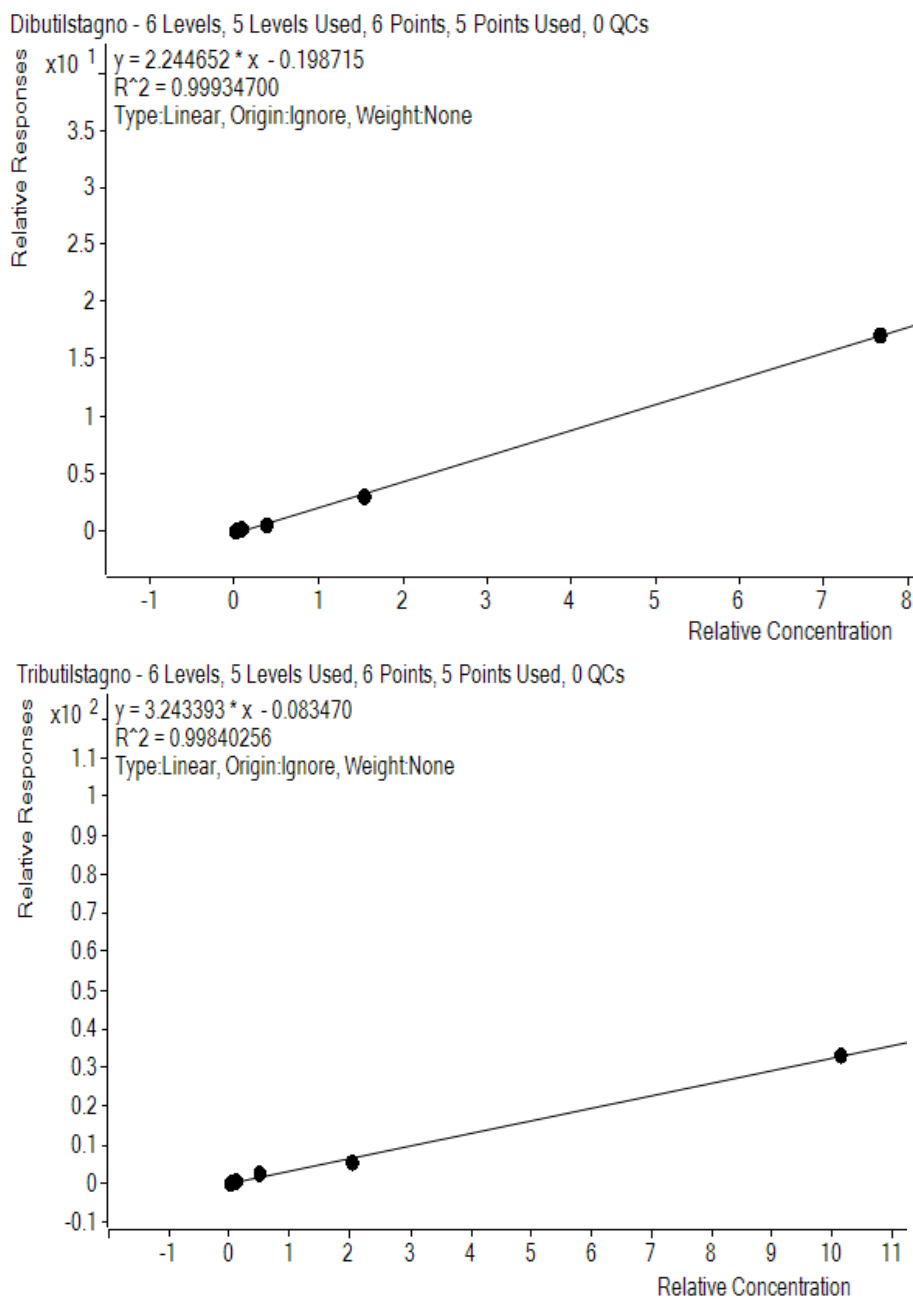


Figura 5: rette di taratura lineare per MTB, DBT e TBT con metodo dei minimi quadrati

Come mostrato in figura 5 anche la regressione lineare con il metodo dei minimi quadrati ha mostrato una linearità accettabile ($R^2 > 0.99$)^[9]. Il metodo RF RSD per la validazione della linearità è preferibile in questo caso in quanto il valore di R^2 è fortemente influenzato dalla presenza di uno standard a concentrazione molto più alta rispetto agli altri.

3.2 Calcolo del LOQ con il metodo di Currie^[11]

Uno degli obiettivi della tesi è di soddisfare i requisiti prestazionali richiesti dalla Tabella 2.4 del Decreto 15 luglio 2016, n. 173 e cioè di poter determinare MBT, DBT e TBT con un $LOQ \leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$. Per confermare il raggiungimento dell'obiettivo è stato determinato il LOQ effettivo per i tre composti utilizzando il metodo di Currie.

Sono state eseguite 8 determinazioni del bianco procedurale utilizzando sabbia di Ottawa come campione e seguendo l'intera procedura descritta al capitolo 2.

Currie utilizza l'errore di tipo α e β (5%) e con 8 prove i gradi di libertà sono 7, la concentrazione corrispondente al LOD è stata così calcolata:

$$x_{LOD} (ng) = 3.79 * Sb/b$$

$$x_{LOQ} (ng) = x_{LOD} (ng) * 3$$

Dove: Sb è la deviazione standard del segnale del bianco, b è la pendenza calcolata con la taratura

Il LOQ è calcolato sul campione tal quale considerando una pesata di 1 g di campione e utilizzando i volumi riportati al capitolo 2:

$$x_{LOQ} (\mu g kg^{-1}) = x_{LOQ} (ng) * 10$$

	MBT	DBT	TBT
LOD (ng)	0.01091	0.00649	0.00023
LOQ (ng)	0.03272	0.01946	0.00070
LOQ ($\mu g/kg$)	<u>0.33</u>	<u>0.19</u>	<u>0.007</u>

Tabella 9: LOQ calcolati per MTB, DBT e TBT

Per tutti e tre i composti è stato verificato un LOQ inferiore al target di 1 $\mu g/kg$.

3.3 Verifica dell'esattezza del metodo mediante analisi di un materiale a concentrazione nota

Il fornitore Wepal (Wageningen University), organizzatore del circuito Quasimeme, ha reso disponibile per l'acquisto un sedimento derivante da una precedente prova interlaboratorio su cui sono stati determinati i composti organostannici.

Il materiale è provvisto del rapporto di prova che comprende i risultati di tutti i partecipanti, il valore assegnato e l'incertezza associata; nel caso del materiale in questione il fornitore dichiara di averlo conservato congelato.

È stato scelto un sedimento con un livello di concentrazione di OTC dello stesso ordine di grandezza dei limiti di legge a cui questo metodo fa riferimento, quindi nel range 1-100 $\mu g/kg$.

Il campione analizzato è il Sediment 26 QSP064MS Estuarine Sediment, Venice Lagoon ed i risultati sono riportati in Tabella 10, con il valore assegnato (NDA Mean) e total error presi direttamente dal rapporto di prova allegato al materiale.

Per la valutazione dell'esattezza del metodo si è utilizzato lo Z-score calcolato con la formula proposta dal fornitore:

$$Z - score = \frac{Risultato - NDA Mean}{total error}$$

Sediment 26	g pesati	ng nella vial	µg/kg	Risultato µg/kg (come Sn)	NDA Mean µg/kg (come Sn)	Total error µg/kg (come Sn)	Z-score
MBT	0.804	7.6972	95.7363	64.64	54.64	9.54	<u>1.05</u>
DBT	0.804	2.1199	26.3669	13.44	11.82	1.59	<u>1.02</u>
TBT	0.804	1.2905	16.0510	6.569	8.119	1.111	<u>-1.39</u>

Tabella 10: Risultati dell'analisi di Sediment 26

Essendo tutti e tre gli Z-score $< |2|$ il metodo ha dimostrato una esattezza accettabile al livello di concentrazione osservato.

4. CONCLUSIONI

Lo sviluppo del metodo ha comportato alcune difficoltà operative, in larga parte attribuibili alla mancanza di un sistema automatizzato per la parte di condizionamento, estrazione SPME e iniezione. Tutte le prove sono state eseguite manualmente e quindi, nonostante la massima disciplina impiegata in questo lavoro, la riproducibilità delle condizioni non può certamente essere paragonabile a quella di un autocampionatore dedicato. L'utilizzo degli standard interni è stato fondamentale per la buona riuscita del metodo e per poter garantire una discreta linearità della risposta strumentale, correggendo in larga parte la variabilità derivante dalla elevata manualità della procedura.

Per lo stesso motivo non è stato possibile eseguire le prove di ripetibilità necessarie per la stima dell'incertezza di misura e le prove per lo studio della robustezza, entrambi passaggi obbligatori qualora il metodo dovesse essere validato, ma che avrebbero richiesto troppo tempo se eseguite manualmente.

L'analisi di un materiale a concentrazione nota ha mostrato una buona esattezza del metodo.

Dotandosi di un autocampionatore per SPME, un vantaggio del metodo proposto è la semplicità della fase di estrazione e la minima quantità di solvente impiegata rispetto a quanto indicato in UNI EN ISO 23161:2019^[4]. Essendo l'estrazione SPME eseguita sullo spazio di testa è inoltre evitata la fase di purificazione dell'estratto.

Per quanto riguarda la sensibilità analitica, la tecnica HS-SPME associata al GC-MS/MS ha mostrato una risposta decisamente adeguata in relazione al range di concentrazione osservato.

Gli obiettivi riportati al paragrafo 1.3 sono stati raggiunti:

- 1) Il metodo è in grado di verificare la conformità ai sedimenti secondo il Decreto 15 luglio 2016, n. 173^[3], con un LOQ minore o uguale a 1 µg/kg s.s. per MBT, DBT e TBT.
È inoltre in grado di verificare la conformità ai limiti per i terreni da bonifica, concentrazioni superiori a 0.1 mg/kg s.s. sono raggiungibili diluendo l'estratto.
- 2) In termini di sensibilità le prestazioni rispetto al metodo di riferimento UNI EN ISO 23161:2019^[4] sono migliori, il LOQ è di almeno dieci volte inferiore rispetto ai 10 µg/kg dichiarati da UNI EN ISO 23161:2019^[4].
Non è stato possibile fare un confronto fra i due metodi in termini di precisione.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Cima, F.; Craig, P.J.; Harrington, C.F. *Organotin Compounds in the Environment* 2003, 101–112.
- [2] Berto D.; Boscolo Brusà R. *I Composti Organostannici in ambiente marino e lagunare. ISPRA, QUADERNI – Ricerca Marina n. 8/2016* 2016, 20-25.
- [3] Decreto 15 luglio 2016, n. 173. *Regolamento recante modalità e criteri tecnici per l'autorizzazione all'immersione in mare dei materiali di escavo di fondali marini.*
- [4] UNI EN ISO 23161:2019 *Qualità del suolo· Determinazione di composti organostannici selezionati · Metodo gascromatografico.*
- [5] Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152 Parte IV - Titolo V Allegato 5.
- [6] Agilent Technologies *Technical Overview: Solid Phase Microextraction Fundamentals.* 2023.
- [7] Lord H.; Pawliszyn J. *Journal of Chromatography* 2000, 885, 153 –193.
- [8] EPA 8270E 2018 *Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry* 12-31.
- [9] EPA 8000D 2018 *Determinative chromatographic separations* 33-41.
- [10] Decreto Ministeriale del 13/09/1999, *Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo.*
- [11] Currie L.A. *Detection and Quantification Limits: Origins and Historical Overview. Analytica Chimica Acta* 1999.