

INDICE

SCOPO	4
PREMESSA	5
1. INTRODUZIONE	6
1.1. IL BACINO SCOLANTE DELLA LAGUNA DI VENEZIA	6
1.2. L'INQUINAMENTO DELLA LAGUNA DI VENEZIA	6
1.3. DIOSSINE E FURANI	7
1.3.1. DATI GENERALI	7
1.3.2. DIFFUSIONE AMBIENTALE	8
1.3.3. COME SI FORMANO	10
1.3.4. FATTORI DI TOSSICITA' EQUIVALENTE	10
1.3.5. LE IMPRONTE	12
1.3.6. NORMATIVA AMBIENTALE NAZIONALE E INTERNAZIONALE	12
2. IL METODO EPA E LE TECNICHE STRUMENTALI	14
2.1. IL METODO EPA 1613/B 1994	14
2.1.1. SINTESI DEL METODO	14
2.1.2. DILUIZIONE ISOTOPICA	15
2.1.3. CONTAMINAZIONI ED INTERFERENZE	16
2.1.4. SILANIZZAZIONE DELLA VETRERIA	16
2.1.5. SICUREZZA IN LABORATORIO	16
2.2. TECNICHE STRUMENTALI	17
2.2.1. INTRODUZIONE TEORICA ALLA SPETTROMETRIA DI MASSA AD ALTA RISOLUZIONE	17
2.2.1.1. IONIZZAZIONE PER IMPATTO ELETTRONICO (EI)	17
2.2.1.2. ANALIZZATORI DI MASSA A SETTORE MAGNETICO	17
2.2.1.2.1. Analizzatori a singolo fuoco	17
2.2.1.2.2. Analizzatori a doppio fuoco	18
2.2.1.3. RISOLUZIONE	20
2.2.1.3.1. Definizione	20
2.2.1.3.2. Valore sperimentale	20
2.2.1.3.3. Massa nominale e massa esatta	20
2.2.1.3.4. Risoluzione necessaria per la separazione di un doppietto	21
2.2.2. STRUMENTAZIONE IMPIEGATA	22
2.2.2.1. POWER PREP	22
2.2.2.2. MAT 95 XP	23
2.2.2.2.1. Configurazione del sistema	23

2.2.2.2.2.	<i>Sistema del vuoto</i>	25
2.2.2.2.3.	<i>Sorgente</i>	25
2.2.2.2.4.	<i>Sistema di introduzione del gas di riferimento</i>	25
2.2.2.2.5.	<i>Ottica</i>	26
2.2.2.2.6.	<i>Settore magnetico</i>	27
2.2.2.2.7.	<i>Settore elettrico (ESA)</i>	27
2.2.2.2.8.	<i>Rivelazione di ioni</i>	28
2.2.2.2.8.1.	<i>SEM</i>	28
2.2.2.2.9.	<i>MID</i>	30
3.	PARTE SPERIMENTALE	31
3.1.	RETE DI MONITORAGGIO	31
3.2.	METODI DI CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE	33
3.3.	MATERIALI E METODI	33
3.3.1.	PROCEDIMENTO	34
3.3.2.	SOLUZIONI STANDARD	34
3.3.2.1.	<i>STANDARD MARCATI DI ESTRAZIONE</i>	34
3.3.2.2.	<i>STANDARD INTERNI DI SIRINGA</i>	35
3.3.3.	PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	35
3.3.4.	ESTRAZIONE LIQUIDO-LIQUIDO	36
3.3.5.	PURIFICAZIONE	36
3.3.5.1.	<i>PURIFICAZIONE MANUALE</i>	36
3.3.5.2.	<i>PURIFICAZIONE AUTOMATICA</i>	37
3.4.	ANALISI STRUMENTALE	39
3.4.1.	PARAMETRI STRUMENTALI	39
3.4.1.1.	<i>CONDIZIONI OPERATIVE DELL'AUTOCAMPIONATORE</i>	39
3.4.1.2.	<i>CONDIZIONI OPERATIVE DEL GASCROMATOGRFO</i>	39
3.4.1.3.	<i>CONDIZIONI OPERATIVE DELLO SPETTROMETRO DI MASSA</i>	40
3.5.	IDENTIFICAZIONE	41
3.5.1.	REQUISITI PER L'IDENTIFICAZIONE	41
3.6.	TARATURA	47
3.6.1.	STANDARD DI TARATURA	47
3.6.2.	TARATURA CON DILUIZIONE ISOTOPICA	48
3.6.3.	TARATURA CON STANDARD INTERNO	48
3.6.4.	TARATURA COMBINATA	49
3.6.5.	VERIFICA DELLA TARATURA	49
3.7.	QUANTIFICAZIONE	50
3.7.1.	QUANTIFICAZIONE PER DILUIZIONE ISOTOPICA	50
3.7.2.	QUANTIFICAZIONE CON STANDARD INTERNO	51
3.7.3.	RECUPERI DEI COMPOSTI MARCATI	51

3.7.4. CALCOLO DELLA CONCENTRAZIONE FINALE	52
4. VALIDAZIONE DEL METODO	53
4.1. DEFINIZIONI	53
4.2. PARAMETRI DI VALIDAZIONE	55
4.2.1. SELETTIVITÀ	55
4.2.2. LINEARITÀ-TARATURA	55
4.2.2.1. VERIFICA DELLA LINEARITÀ	55
4.2.2.2. MODALITÀ DI TARATURA	59
4.2.3. LIMITE DI RIVELABILITÀ (MDL)	59
4.2.3.1. SCOPO	59
4.2.3.2. BIANCO	59
4.2.3.3. PROCEDIMENTO PER LA DETERMINAZIONE DELL' MDL	59
4.2.3.4. DETERMINAZIONE STATISTICA DEGLI OUTLIERS	60
4.2.3.5. REQUISITI DI ACCETTABILITÀ DELL' MDL	61
4.2.4. LIMITE DI QUANTIFICAZIONE (LOQ)	64
4.2.5. RIPETIBILITÀ STRETTA	65
4.2.5.1. VALUTAZIONE DELLA RIPETIBILITÀ	65
4.2.5.2. LIMITE DI RIPETIBILITÀ	65
4.2.6. CAMPO DI APPLICAZIONE	65
4.2.7. INCERTEZZA DI MISURA	66
4.2.7.1. UTILIZZO DI EQUAZIONI EMPIRICHE	66
5. RISULTATI E CONCLUSIONI	67
5.1. ESPRESSIONE DEI RISULTATI	67
5.2. ELABORAZIONE DEI RISULTATI ANALITICI	67
5.3. CONCLUSIONI	71
6. BIBLIOGRAFIA	73
RINGRAZIAMENTI	75

SCOPO

Scopo della tesi è la validazione del metodo per la determinazione quantitativa di policlorodibenzodiossine (PCDD) e policlorodibenzofurani (PCDF) in acque superficiali applicando il metodo EPA 1613 rev. B del 1994, con nuovi sistemi di purificazione introdotti per ridurre il tempo di analisi.

Scopo del presente lavoro è inoltre l'analisi di acque superficiali di stazioni di foce del Bacino Scolante della Laguna di Venezia, prelevate durante le campagne di monitoraggio negli anni 2007 – 2008. Sia il campionamento sia l'analisi sono stati eseguiti dall'Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale del Veneto (ARPAV) – Servizio Laboratori di Venezia. I risultati ottenuti sono stati utilizzati per il calcolo dell'indice di tossicità equivalente (TEQ) delle diossine e furani e commentate rispetto al D.M. 23 aprile 1998 (Decreto Ronchi-Costa).

PREMESSA

Il termine “diossina” rimanda subito ad eventi incidentali rimasti impressi nella memoria a causa delle conseguenze catastrofiche sulla popolazione e sull’ambiente. Tra questi i più gravi sono avvenuti all’ICMESA, Seveso (Italia, 1976) e a Bhopal (India, 1984).

Durante la guerra del Vietnam, l’eccessivo utilizzo di defoliante contaminato da diossina, noto come agente orange, ha provocato gravi danni alla salute dell’uomo da esposizione alle diossine.

L’interesse scientifico per queste sostanze è quindi cresciuto nel tempo al fine di valutarne le conseguenze per l’ambiente e per la salute umana.

L’ampliarsi delle conoscenze scientifiche ha inoltre reso possibile che le autorità nazionali e della comunità internazionale sviluppassero normative, regolamenti e venissero stipulate molte convenzioni riguardanti tali contaminanti.

Diossine e furani costituiscono due delle dodici classi di inquinanti organici persistenti (POPs) riconosciute nella Convenzione di Stoccolma del 2001. La Convenzione, firmata da oltre 120 nazioni, è un Trattato internazionale legalmente vincolante che vieta la produzione, l’uso ed il rilascio di sostanze chimiche pericolose (POPs). L’obiettivo del Trattato è quello di eliminare tutti i POPs iniziando dalla lista dei “dodici”.

Queste classi di sostanze tossiche e persistenti causano effetti negativi sulla salute umana e sull’ambiente quali tossicità dermica, immunotossicità, effetti negativi sulla riproduzione, teratogenicità, disturbi al sistema endocrino e carcinogenicità. La via preferenziale per l’esposizione umana è data dal consumo di cibo contaminato da diossina. Le caratteristiche di bioaccumulo e di esposizione a lungo termine (additiva) di questi inquinanti fanno sì che anche una quantità minima di diossine possa determinare questi effetti negativi sulla salute.

Per questi motivi è necessario studiare e monitorare le fonti, le vie di diffusione di questi contaminanti, per poi controllarne il valore nel tempo, ridurre l’inquinamento ambientale ed il rischio di esposizione a tali inquinanti.

Tanto più in un ecosistema così fragile ed unico come la Laguna di Venezia, ambiente sfruttato soprattutto nel secolo scorso dalla vicina zona industriale e dall’attività antropica, che, nonostante tutto, va salvaguardato e preservato dalla minaccia dell’inquinamento.

1. INTRODUZIONE

1.1. IL BACINO SCOLANTE DELLA LAGUNA DI VENEZIA

Le foci dei grandi fiumi e le zone lagunari sono ambienti particolari, in corrispondenza dei quali si realizza la confluenza tra terra e mare ed il mescolamento delle acque dolci con quelle salate.

Per laguna si intende uno specchio d'acqua lungo la costa o un bacino costiero in cui penetrano sia le acque marine sia quelle continentali, dominato dalle maree, separato dal mare da un cordone litorale (insieme di lidi), ma comunicante con esso attraverso bocche lagunari (foci).

Le lagune, ambienti litorali semichiusi, presentano un ridotto idrodinamismo, e di conseguenza una forte sedimentazione, un accumulo di materiali di diversa natura e un aumento di particolato in sospensione.

Il Bacino Scolante è quella parte di terraferma che convoglia le acque piovane e fluviali in laguna. Ha una superficie di 1.880 km² attraversata da una rete idrica di oltre 2.500 km che riversa in laguna, attraverso 27 sbocchi, circa 2,8 milioni di m³ di acqua al giorno e 15.000 m³ di sedimento l'anno.

Il territorio del bacino scolante è suddiviso tra 98 comuni che fanno parte delle province di Venezia, Padova e Treviso, per un totale di quasi 1.500.000 abitanti.

1.2. L'INQUINAMENTO DELLA LAGUNA DI VENEZIA

La caratteristica della laguna è di essere un bacino semichiuso a lento ricambio idrico. In particolare per quanto riguarda la laguna di Venezia a partire dal 1917 iniziò la realizzazione del polo industriale con la sottrazione di circa 500 ettari alla laguna e del conseguente sconvolgimento dell'ecosistema della laguna di Venezia: abbassamento del suolo ed inquinamento.

Il problema dell'inquinamento delle acque nella Laguna di Venezia è un fenomeno molto complesso dovuto alle molteplici fonti inquinanti ed alla peculiarità dell'ambiente. La laguna viene infatti utilizzata come corpo ricevente per le acque di scarico di varie attività produttive e di insediamenti urbani che comprendono:

- le città di Venezia e Chioggia, i litorali, le isole lagunari in gran parte prive di rete fognaria e di impianti di depurazione;
- la terraferma veneziana con una rete fognaria incompleta e solo alcuni impianti di depurazione in funzione;
- le due zone industriali ed il sito energetico di Porto Marghera;
- i comuni dell'entroterra veneto che scaricano le loro acque nei corsi d'acqua scolanti in laguna;
- i circa 185.000 ettari di territorio sede di attività agricola con connesso impiego di fertilizzanti organici ed inorganici, pesticidi ecc., le cui acque di

scolo confluiscono in laguna attraverso i corsi d'acqua naturali ed i collettori di bonifica;

- transito di natanti e di navi che immettono in laguna i prodotti di scarico derivati dalla combustione incompleta del carburante oltre alle eventuali perdite di idrocarburi;
- il traffico veicolare automobilistico, con un areale che presumibilmente interessa anche la laguna.

Il carico inquinante che deriva da queste fonti è notevole e supera la capacità della laguna di svolgere un processo di rigenerazione delle acque, di rimineralizzazione dei composti organici e di diluizione di quelli inorganici tali da riportare le concentrazioni delle varie sostanze a valori paragonabili a quelli presenti nelle acque del mare.

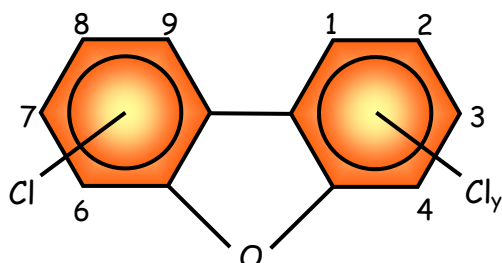
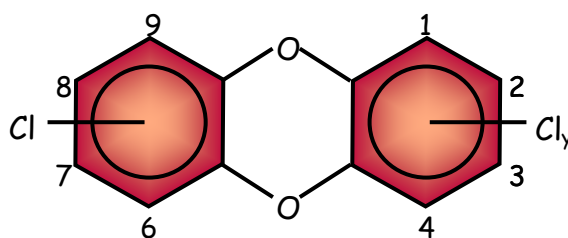
Negli ultimi anni, negli studi sull'inquinamento lagunare hanno assunto particolare rilevanza i microinquinanti organici, difficilmente degradabili o parzialmente degradabili, i cosiddetti POP.

1.3. DIOSSINE E FURANI

1.3.1. DATI GENERALI

Con il termine generico “diossine” si indica un gruppo di 210 composti chimici aromatici policlorurati, divisi in due famiglie: dibenzo-p-diossine (PCDD o “diossine”) e dibenzo-p-furani (PCDF o “furani”). Si tratta di sostanze tossiche che, grazie alla stabilità chimica e al carattere lipofilo, sottostanno a processi di bioaccumulo e biomagnificazione. Ciò si traduce nel fatto che anche una contaminazione ambientale a livelli inferiori a parti per miliardo può creare pericoli per l'uomo, ultimo anello della catena alimentare.

Policlorodibenzodiossine (PCDD)
N = 75



Policlorodibenzofurani (PCDF)
N = 135

Figura 1.1: formula di struttura delle diossine e dei furani.

In totale esistono 75 congeneri di diossine e 135 di furani (Figura 1.1): di questi però solo i 17 (7 PCDD e 10 PCDF rispettivamente) congeneri cloro sostituiti contemporaneamente almeno nelle posizioni 2,3,7,8 destano particolare preoccupazione dal punto di vista tossicologico.

La tossicità delle diossine dipende dal numero e dalla posizione degli atomi di cloro sull'anello aromatico, le più tossiche possiedono 4 atomi di cloro legati agli atomi di carbonio β dell'anello aromatico e pochi o nessuno atomo di cloro legati in posizione α .

Comunemente il termine "diossina" viene usato come sinonimo della 2,3,7,8-tetraclorodibenzodiossina (TCDD), ossia del congenere maggiormente tossico, unico riconosciuto possibile cancerogeno per l'uomo e classificato di gruppo 1 dall'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro IARC (Figura 1.2).

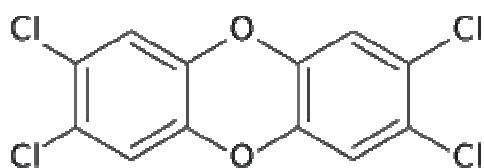


Figura 1.2: formula di struttura della 2,3,7,8-TCDD.

Le diossine sono sostanze termostabili, scarsamente polari, insolubili in acqua, altamente liposolubili, estremamente resistenti alla degradazione chimica e biologica. Nel suolo si legano alla frazione organica presente e, una volta adsorbite, rimangono relativamente immobili: a causa della loro insolubilità in acqua non tendono a migrare in profondità.

1.3.2. DIFFUSIONE AMBIENTALE

L'ambiente acquatico può ricevere le PCDD/F attraverso:

- la deposizione atmosferica;
- l'immissione di reflui industriali;
- il dilavamento di suoli contaminati.

Una volta immesse nei corpi idrici, le diossine possono volatilizzare e quindi rientrare in atmosfera, o adsorbirsi ai sedimenti o bioaccumularsi negli organismi (Figura 1.3).

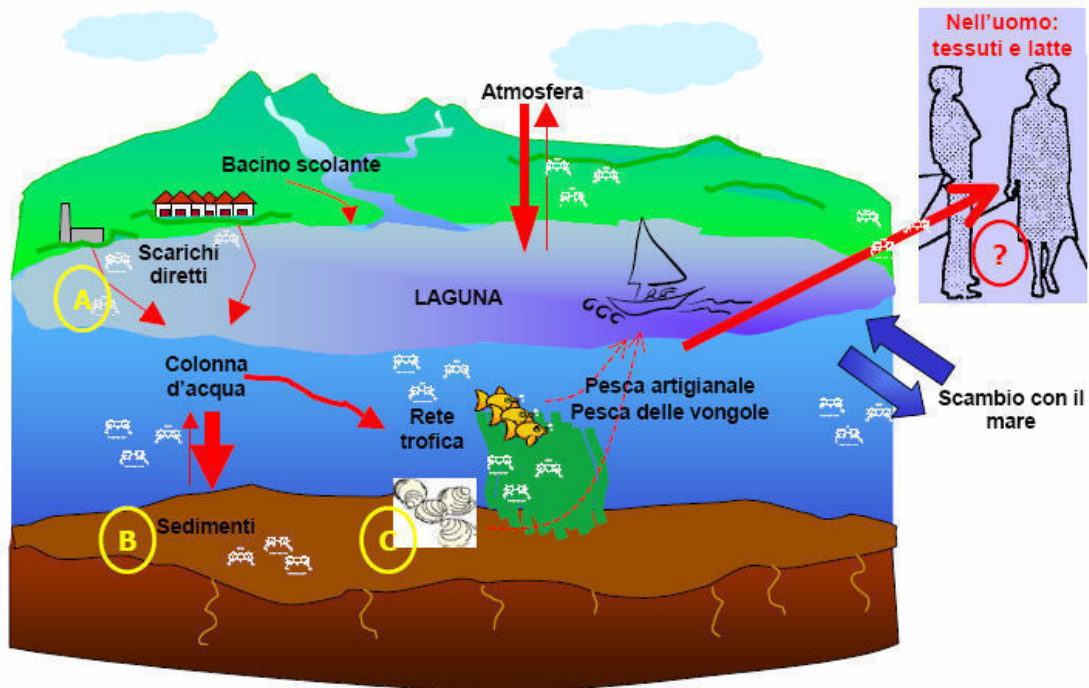


Figura 1.3: fonti di diossina nella laguna veneziana e loro possibile diffusione nell'ambiente.
A) scarichi industriali B) sedimenti C) biota.

Pur essendo scarsamente idrosolubili, le diossine trovano nell'acqua un'ottima via di diffusione una volta adsorbite sulle particelle minerali ed organiche presenti in sospensione. Le caratteristiche chimico-fisiche rendono le diossine sostanze facilmente trasportabili dalle correnti atmosferiche, ed, in misura minore, dai fiumi e dalle correnti marine, favorendo così la contaminazione di luoghi lontani dalle sorgenti di emissione.

Infatti questi composti hanno ormai raggiunto una diffusione globale, perchè sono presenti anche in zone del pianeta dove non è mai avvenuta né la produzione né la diffusione deliberata. La ragione di questo fenomeno è che, una volta immessi nell'atmosfera e depositatisi a una certa distanza dalla fonte di origine, subiscono una serie di re-emissioni e rideposizioni dovute a cicli di evaporazione/condensazione che si ripetono indefinitamente (il fenomeno è noto come grasshopper effect, in italiano "salto della cavalletta"). Questo processo prosegue fino a che i POP non raggiungono le latitudini nordiche o altitudini elevate dove, per effetto delle basse temperature, tendono a condensare definitivamente e ad accumularsi.

A causa della loro presenza ubiquitaria nell'ambiente, persistenza e liposolubilità, le diossine tendono, nel tempo, a bioaccumularsi nei tessuti adiposi e negli organi dell'uomo e degli animali. Inoltre, per biomagnificazione, salendo nella catena trofica, la concentrazione di tali sostanze può aumentare giungendo ad esporre a rischio maggiore il vertice di detta catena.

1.3.3. COME SI FORMANO

Le diossine sono sostanze che non vengono mai prodotte deliberatamente bensì si formano come sottoprodotti indesiderati di taluni processi chimici e/o di combustione.

La loro formazione è favorita in presenza di composti aromatici clorurati ed in processi che avvengono ad elevate temperature (800-900°C).

Tra i processi chimici emergono quelli di produzione delle plastiche, di composti chimici (pesticidi e diserbanti clorurati), di sbiancamento della carta, e, nelle raffinerie, di produzione degli oli combustibili.

Possibili fonti di diossine sono anche i processi di combustione che si possono distinguere in:

- combustioni incontrollate, tra le quali:
 - incendi accidentali ed all'aperto di materiali eterogenei, quali rifiuti urbani, pneumatici, ecc.;
 - incendi boschivi in presenza di composti chimici clorurati per la combustione di lignina e cellulosa;
 - eruzioni vulcaniche con meccanismo di produzione di diossine analogo agli incendi boschivi.
- combustioni controllate (volontarie) di:
 - rifiuti solidi urbani (incenerimento);
 - fanghi (incenerimento);
 - carburante/combustibili nei processi di produzione del cemento;
 - carburante/combustibili nei processi di fusione dei metalli ferrosi e non;
- altre combustioni controllate per la produzione di energia:
 - trasporti (per l'utilizzo di combustibili che contengono composti clorurati);
 - combustione di legno trattato;
 - combustione di oli combustibili.

Come composti precursori della formazione di diossine troviamo il Pentaclorofenolo, i PCB (Policlorobifenili), le cloroparaffine negli oli usati, il cloro inorganico e le termoplastiche. Questi composti chimici vengono utilizzati per la produzione di conservanti del legno, di pesticidi, nell'industria del cuoio e della pelle in generale e nell'industria delle plastiche.

1.3.4. FATTORI DI TOSSICITA' EQUIVALENTE

Generalmente le diossine non vengono rilevate come singoli composti, ma come miscele complesse dei diversi congeneri; ciascun congenere ha una differente tossicità.

Per riuscire ad esprimere la tossicità dei singoli congeneri, è stato introdotto il concetto di fattore di tossicità equivalente (TEF). I fattori di tossicità equivalente si basano sulla considerazione che i PCDD/F sono composti strutturalmente simili che presentano il medesimo meccanismo strutturale di azione (attivazione del recettore Ah) e producono effetti tossici simili. I TEF vengono calcolati confrontando l'affinità di legame dei vari composti organoclorurati con il recettore Ah, rispetto a quella della

2,3,7,8-TCDD, considerando l'affinità di questa molecola come il valore unitario di riferimento.

Per esprimere la concentrazione complessiva di diossine (TEQ) si è introdotto il concetto di tossicità equivalente (TEQ) che si ottiene sommando i prodotti tra i valori TEF dei singoli congeneri e le rispettive concentrazioni:

$$TEQ = \sum_{i=1}^n (C_i * TEF_i) \quad (1.1)$$

Per i TEF sono stati proposti due schemi di classificazione, il primo, sviluppato in ambito NATO, è utilizzato principalmente per misurare i livelli di concentrazione delle diossine nelle diverse matrici ambientali (acqua, aria, suolo) in relazione agli standard di qualità stabiliti da norme e regolamenti (sistema I-TE, International Toxicity Equivalent). Il secondo, sviluppato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, è utilizzato per valutare il grado di tossicità di questi composti in relazione agli effetti sulla salute umana (sistema WHO-TE, World Health Organization) (Tabella 1.1):

PCDD/F	I-TEFs (NATO)	WHO-TEFs (1998)	WHO-TEFs (2005)
2,3,7,8-TCDD	1	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	0,5	1	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	0,01	0,01
OCDD	0,001	0,0001	0,0003
2,3,7,8-TCDF	0,1	0,1	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	0,05	0,03
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	0,5	0,3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	0,1	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	0,01	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01	0,01	0,01
OCDF	0,001	0,0001	0,0003

(T=tetra, Pe=penta, Hx=hexa, Hp=hepta, O=octa)

Tabella 1.1: fattori di tossicità equivalente secondo NATO e WHO.

I fattori di tossicità equivalente vengono periodicamente aggiornati sulla base delle nuove informazioni che emergono dagli studi tossicologici di queste sostanze. Nel 2005 la scala dei fattori WHO-TE è stata aggiornata, modificando i precedenti valori di TEF per alcuni congeneri (Tabella 1.1). Secondo quanto raccomandato dall'OMS, i nuovi valori di TEQ dovrebbero essere applicati da subito; tuttavia, non tutte le nazioni, compresa l'Italia, hanno provveduto ad aggiornare i documenti normativi.

1.3.5. LE "IMPRONTE"

La distribuzione dei congeneri rilevati nelle analisi fornisce una specie di impronta digitale, che può far risalire al tipo di processo che ha portato alla loro formazione. Le impronte caratteristiche delle PCDD/F che si formano durante vari processi industriali e di combustione sono state documentate e, quando vi è un'unica fonte principale di rilascio, è possibile identificare la sorgente di un inquinamento ambientale.

Le impronte relative alle combustioni ed agli scarichi civili mostrano normalmente una predominanza di OCDD con presenza di furani leggeri (TCDF, PeCDF), mentre le impronte legate a processi chimici del cloro mostrano una predominanza dell'OCDF con forte presenza di HpCDF. Nei processi di produzione di cloruro di vinile e PVC, cloroderivati organici, cloro-soda, e nei vari impianti che utilizzano intermedi clorurati, si producono diossine con impronte caratteristiche. Come conseguenza di questi processi industriali possono prodursi contaminazioni ambientali caratterizzate dalla cosiddetta "impronta del cloro".

1.3.6. NORMATIVA AMBIENTALE NAZIONALE E INTERNAZIONALE

La Direttiva 2000/60 Ce del 23 ottobre 2000 rappresenta un quadro di riferimento per l'azione comunitaria a livello di acque cui gli Stati membri dovranno uniformarsi per lo sviluppo delle proprie politiche ambientali nei prossimi decenni. Lo scopo della direttiva è quello di fornire un quadro legislativo trasparente, efficace e coerente per coordinare, integrare e sviluppare ulteriormente, nel lungo periodo, le politiche e le azioni degli Stati membri per la protezione e l'utilizzo sostenibile delle acque comunitarie.

Per la laguna di Venezia ed il bacino scolante gli obiettivi di qualità relativi agli elementi chimico-fisici sono già stati fissati dal Decreto interministeriale del 23 aprile 1998, cosiddetto decreto "Ronchi-Costa", e successive emanazioni e modificazioni, dal titolo "Requisiti di qualità delle acque e caratteristiche degli impianti di depurazione per la tutela della laguna di Venezia" che indica i valori guida e i valori imperativi per le acque e stabilisce la necessità di effettuare campagne di monitoraggio delle acque della laguna.

L'attività di monitoraggio è ancora oggi effettuata da ARPAV (Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale del Veneto) per quanto riguarda il Bacino Scolante e dal Magistrato alle Acque per quanto riguarda la laguna di Venezia, che controllano le concentrazioni di inquinanti fissate dall'altro decreto interministeriale del 30 luglio 1999 "Limiti agli scarichi industriali e civili che recapitano nella laguna di

Venezia, nei corpi idrici del suo bacino scolante, ai sensi del punto 5 del decreto interministeriale del 23 aprile 1998”.

Altre importanti azioni si sono susseguite per incentivare la tutela e per fornire maggiori strumenti di controllo. Dopo il Decreto “Ronchi-Costa”, sono state emanate altre normative che individuano le migliori tecnologie di depurazione e di processo da adottare nell’ambito dell’area industriale di Porto Marghera per ridurre le emissioni di diossina e degli altri inquinanti negli scarichi dei reflui in laguna (DM 26 maggio 1999), inoltre sono stati fissati i nuovi limiti allo scarico per i reflui industriali (DM 30 luglio 1999).

Il decreto “Ronchi-Costa” ha stabilito gli obiettivi di qualità per le acque della laguna. Questi obiettivi non sono limiti di legge, ma livelli di concentrazione degli inquinanti nelle acque lagunari a cui tendere per assicurare la tutela della salute umana e l’integrità dell’ecosistema lagunare.

Il decreto “Ronchi-Costa” ha stabilito un valore obiettivo unico, sia esso imperativo o guida, per l’intera laguna. Per quanto riguarda le diossine, lo standard di qualità è 0.013 pg/L.

Il decreto 23 aprile 1998 prevede che la misura venga effettuata per tutti gli inquinanti sulla frazione disciolta, dopo aver rimosso per filtrazione tutte le particelle sospese, di qualunque natura, presenti nel campione.

Tuttavia, è ben noto che gli inquinanti organici persistenti, in particolare le diossine, sono caratterizzati da una scarsa solubilità in acqua e pertanto nell’ambiente acquatico sono prevalentemente presenti in sospensione ed associati al particolato sospeso, costituito dalle frazioni colloidali dei sedimenti, del fitoplancton e delle altre sostanze organiche presenti nella massa d’acqua. Di conseguenza, per tali contaminanti la quantità disciolta rappresenta solo una frazione della contaminazione complessiva che caratterizza l’ambiente acquatico. Inoltre, essendo altamente affini alla sostanza organica, queste sostanze, associate al particolato sospeso, vengono facilmente trasferite ai tessuti dei pesci e delle altre specie, quali molluschi e crostacei, attraverso l’apparato branchiale e gli organi filtratori dando così inizio al processo di bioaccumulo lungo la rete trofica. Per questa ragione la Comunità Europea ha raccomandato che, nella valutazione degli standard di qualità dei microinquinanti organici si dovesse sempre fare riferimento alla frazione totale e non a quella disciolta.

2. IL METODO EPA E LE TECNICHE STRUMENTALI

La United States Environmental Protection Agency (US-EPA) è l'agenzia governativa ambientale statunitense incaricata di proteggere la salute umana e di salvaguardare l'ambiente naturale: aria, acqua e suolo. L'Agenzia è stata fondata il 2 dicembre del 1970 per condurre valutazioni, ricerche ed educazione ambientali avvalendosi di personale specializzato, tra cui ingegneri, scienziati, avvocati, finanziari ed informatici. Il motivo fondamentale per cui è stata fondata l'EPA è stato quello di riparare ai danni ambientali, ormai già fatti, e di stabilire criteri nuovi per guidare gli Americani verso un'America più pulita e sicura.

2.1. IL METODO EPA 1613/B 1994

Il metodo EPA 1613 del 1994, rev.B, ha per scopo la determinazione delle dibenzo-p-diossine (PCDDs) e dei dibenzo-p-furani (PCDFs) con grado di clorurazione da 4 a 8 (2,3,7,8-clorosostituiti) in acqua, suolo, sedimento, fango, tessuti e altre matrici utilizzando la gascromatografia ad alta risoluzione accoppiata con la spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC/HRMS).

2.1.1. SINTESI DEL METODO

Il metodo è articolato in numerosi passaggi, il che comporta lunghi tempi di esecuzione. Il campione infatti, prima di essere sottoposto ad analisi strumentale, subisce più fasi che si differenziano per tipo di matrice e che possono essere riassunte in: pretrattamento del campione (sez. 11), estrazione (sez. 12) e purificazione (sez. 13) (vd. Figura 2.1).

Ai paragrafi § 1.5 e § 9.1.2 è specificato che ogni modifica al metodo è permessa al fine di ridurre le interferenze od abbassare i costi di analisi purché vengano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità richiesti.

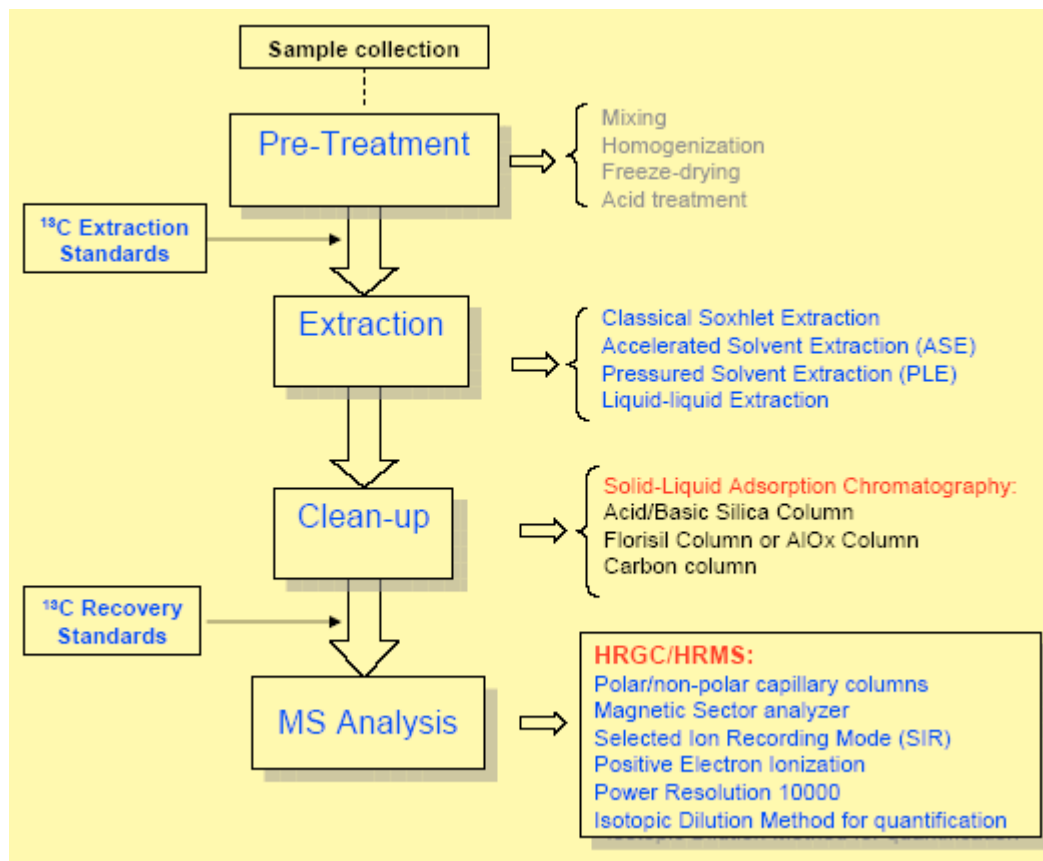


Figura 2.1: schema a blocchi delle varie fasi di trattamento del campione prima dell'analisi strumentale.

2.1.2. DILUIZIONE ISOTOPICA

La determinazione delle diossine e dei furani avviene per diluizione isotopica, tecnica che consiste nell'aggiunta al campione di quantità note di sostanze arricchite in isotopi stabili marcati con $^{13}\text{C}_{12}$.

I composti marcati hanno caratteristiche chimico-fisiche equivalenti agli analiti ricercati e hanno un diverso valore massa/carica, a livello di analisi GC/MS, derivante dalla struttura isotopica stabile utilizzata.

Il campione viene arricchito con due diverse miscele di standard isotopicamente marcati sul carbonio:

- in fase di estrazione-purificazione (standard di estrazione o di processo);
- in fase di analisi strumentale (standard di siringa o di iniezione).

Il metodo di diluizione isotopica ha quindi i pregi di:

- controllo delle fasi del metodo e della singola analisi attraverso i recuperi dei marcati;
- identificazione con m/z e rapporto isotopico in base alla corrispondenza del tempo di ritenzione;
- quantificazione mediante tecnica dello standard interno.

2.1.3. CONTAMINAZIONI ED INTERFERENZE

Nel metodo, la sezione 4 sottolinea l'importanza di una pulizia estrema della vetreria e della purezza dei reagenti per evitare contaminazioni e ridurre al minimo qualsiasi tipo di interferenza.

La vetreria non solo può essere fonte di contaminazione dei campioni ma può anche sottrarre gli analiti di interesse all'analisi per adsorbimento sulle superfici del vetro.

I composti interferenti si possono trovare a concentrazioni ben superiori a quelli riscontrati per le diossine; i composti più frequenti possono essere bifenili clorurati (PCB), metossi-bifenili, idrofenildifenileteri, benzilfenileteri, aromatici polinucleari e pesticidi. Poichè con questo metodo vengono misurati livelli molto bassi di PCDDs/PCDFs, l'eliminazione di queste interferenze è essenziale.

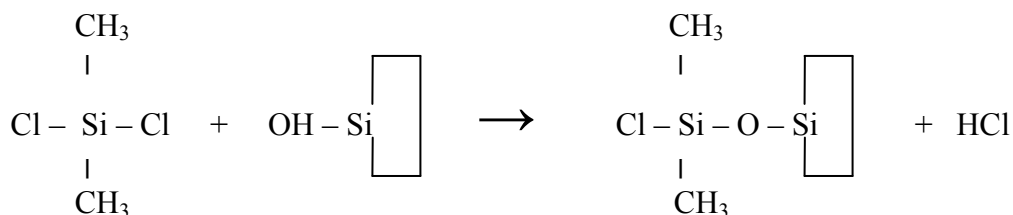
Per questo motivo si è scelto di utilizzare solventi ultrapuri, o perlomeno reagenti testati per i pesticidi, e di pretrattare ogni pezzo di vetreria che venga a contatto coi campioni o con gli standard marcati con soluzione solforica e successivamente con soluzione silanizzante.

2.1.4. SILANIZZAZIONE DELLA VETRERIA

Nel processo di silanizzazione, oltre al regolare lavaggio con detergente basico, tutte le superfici interne della vetreria vengono acidificate (con una soluzione a base di acido solforico e persolfato d'ammonio) e successivamente silanizzate con una soluzione al 5% di dimetildiclorosilano in toluene. Il tutto intervallato da step di risciacquo con acqua di rubinetto, acqua milliQ ed infine acetone RS. Al termine del trattamento la vetreria viene asciugata in stufa a 250° C per 3 ore.

La funzione dell'ammonio persolfato è quella di ossidare le eventuali tracce organiche residue con la conseguente formazione di siti attivi sulla superficie del vetro.

La fase di silanizzazione vera e propria serve a disattivare i siti liberati in modo da impedire l'aggrapparsi di eventuali analiti sulla vetreria, quindi la contaminazione della vetreria e la sottrazione di analiti ricercati all'analisi.



2.1.5. SICUREZZA IN LABORATORIO

La sezione 5 è dedicata alla sicurezza in laboratorio. Anche se non è accertata la cancerogenicità di ciascuno dei composti o reagenti usati, comunque l'utilizzo di sostanze chimiche è un potenziale rischio per la salute perciò l'esposizione a questi composti va ridotta al livello più basso possibile. Si raccomanda di lavorare sempre sotto cappa, assicurandosi che l'aspirazione sia ottima, e di utilizzare tutti i dispositivi di protezione individuale necessari.

2.2. TECNICHE STRUMENTALI

2.2.1. INTRODUZIONE TEORICA ALLA SPETTROMETRIA DI MASSA AD ALTA RISOLUZIONE

2.2.1.1. IONIZZAZIONE PER IMPATTO ELETTRONICO (EI)

La ionizzazione avviene per interazione tra un fascio elettronico e le molecole neutre di analita in uscita dalla colonna cromatografica.

Il fascio di elettroni è ottenuto per effetto termoionico, scaldando ad elevata temperatura un filamento di metallo; il riscaldamento viene ottenuto facendo passare una corrente di intensità opportuna.

L'energia degli elettroni emessi dal filamento metallico può essere facilmente modulata mediante l'applicazione di una differenza di potenziale tra filamento e sorgente ionica. In genere, l'energia media degli elettroni è dell'ordine dei 70 eV.

Gli ioni così generati nella camera di ionizzazione passano attraverso una serie di lenti costituite da elettrodi a differenti potenziali che hanno la funzione di accelerare gli ioni nella direzione dell'analizzatore.

Quindi uno ione di massa m e carica z sottoposto all'azione di un potenziale di accelerazione V avrà una energia potenziale che, dopo l'accelerazione, verrà trasformata in energia cinetica secondo l'equazione:

$$zV = \frac{1}{2} mv^2 \quad (2.1)$$

2.2.1.2. ANALIZZATORI DI MASSA A SETTORE MAGNETICO

2.2.1.2.1. Analizzatori a singolo fuoco

Lo ione, dopo l'accelerazione, viene quindi ad acquistare una velocità v . Se immerso in un campo magnetico, questo ione verrà a percorrere una traiettoria circolare di raggio r per azione della forza di Lorentz: $F = zv \times B$ (centripeta) (vd. Figura 2.2).

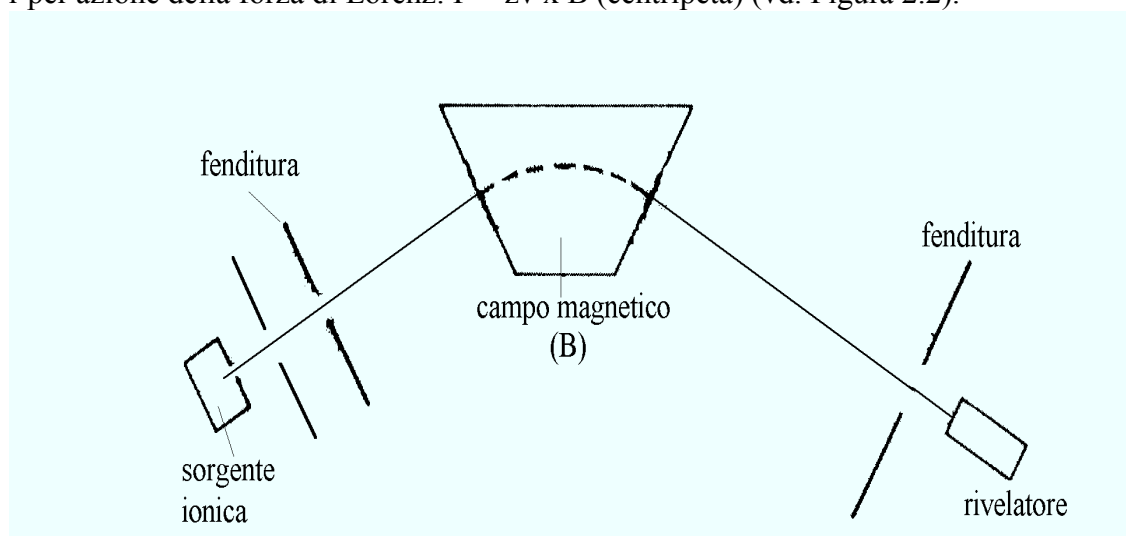


Figura 2.2: spettrometro di massa a settore magnetico.

Uguagliando le forze centripeta e centrifuga a cui è sottoposto lo ione, si avrà:

$$mv^2/r = zvB \quad (2.2)$$

Unendo le equazioni (2.1) e (2.2) si ottiene il rapporto:

$$m/z = r^2 B^2 / 2V \quad (2.3)$$

secondo cui, per B e V costanti, ioni di diverso rapporto m/z percorrono traiettorie circolari di raggio r diversi (vd. Figura 2.3).

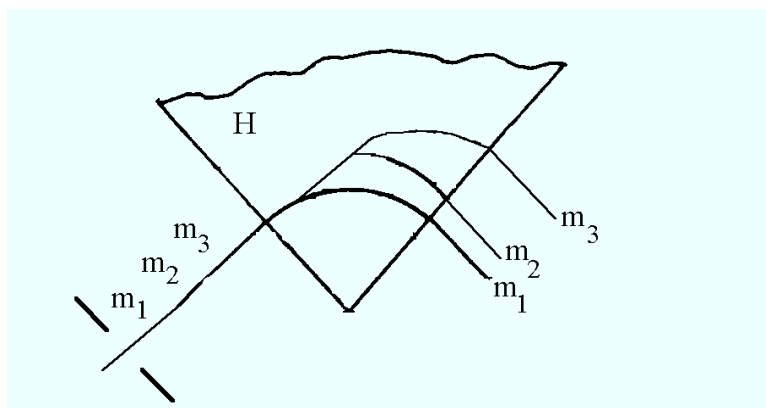


Figura 2.3

Il campo magnetico, oltre ad avere l'effetto di separare ioni di diverso valore di m/z, ha anche la proprietà di focalizzare il fascio ionico (necessariamente divergente per la repulsione elettrostatica tra cariche dello stesso segno) in un ben preciso punto geometrico. Per questo motivo, tramite il settore magnetico avviene la prima focalizzazione del fascio ionico.

2.2.1.2.2. *Analizzatori a doppio fuoco*

Il fascio ionico emesso dalla sorgente di ioni non è solo disomogeneo in direzione ma anche in energia cinetica. Dalla equazione (2.1), si sottolinea come ioni prodotti in punti diversi della sorgente ionica sperimentino potenziali di accelerazione differenti. Questa "distribuzione" di energia potenziale si riflette su una distribuzione di energia cinetica che porta a sensibili abbassamenti della risoluzione (vd. par. 2.2.1.3) dello strumento.

Per ovviare a tale fenomeno si ricorre all'uso del settore elettrostatico, costituito da due elettrodi a sezione cilindrica tra loro paralleli, ai quali viene imposta una certa differenza di potenziale.

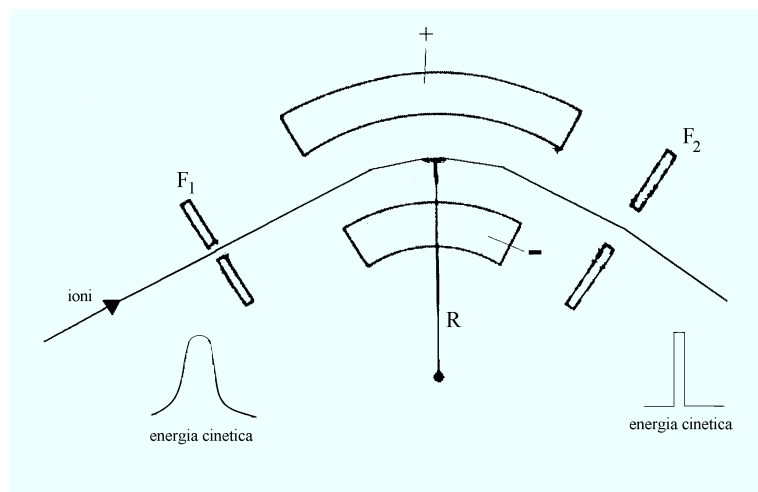


Figura 2.4: settore elettrostatico.

All'interno di questo campo gli ioni sono soggetti a forze centripete e centrifughe di uguale intensità:

$$zE = mv^2/R \quad (2.4)$$

Solo ioni con un ben definito valore di energia cinetica percorrono la traiettoria di raggio R che permette il passaggio attraverso la fenditura F2 (vd. Figura 2.4). Si ha così una focalizzazione in energia che porta a sensibili incrementi (anche di due ordini di grandezza) della risoluzione.

Uno strumento con settore magnetico ed elettrostatico viene quindi definito come "strumento a doppia focalizzazione" (in direzione ed energia) (vd. Figura 2.5).

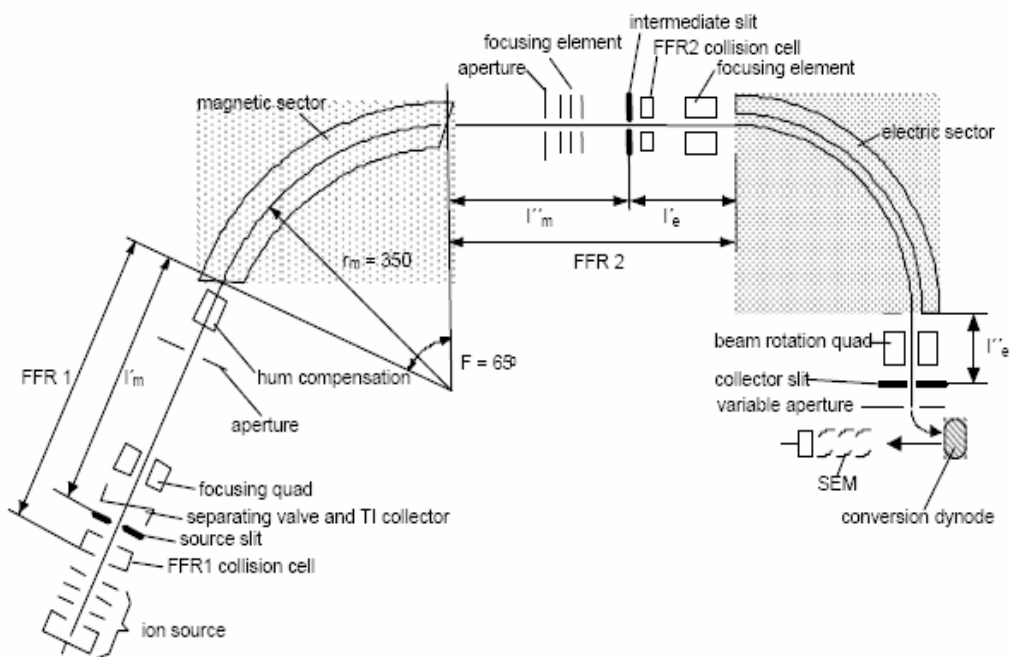


Figura 2.5: Analizzatore di massa a doppio fuoco - Diagramma Schematico ottica MAT 95 XP.

2.2.1.3. RISOLUZIONE

2.2.1.3.1. Definizione

La risoluzione di un analizzatore di massa, intesa come la capacità di un analizzatore di separare ioni con valori di massa adiacenti m_1 ed m_2 , viene così definita:

$$R = m_2 / (m_2 - m_1) = m / \Delta m \quad (2.5)$$

Valori sufficientemente elevati di risoluzione permettono di calcolare la massa esatta di uno ione e di risalire alla sua composizione elementare.

2.2.1.3.2. Valore sperimentale

Consideriamo due picchi vicini di massa m_1 e m_2 , separati dalla distanza L (Figura 2.6). Se l è la larghezza di un picco misurata ad una certa percentuale n (normalmente al 10%) dell'altezza del picco, Δm può essere calcolato da :

$$\Delta m = (m_2 - m_1) l / L \quad (2.6)$$

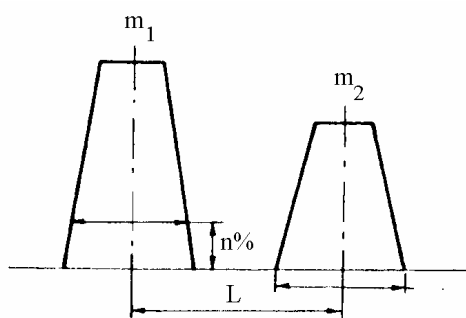


Figura 2.6

2.2.1.3.3. Massa nominale e massa esatta

Per massa nominale di uno ione si intende quella ottenuta considerando la massa intera dei vari nuclidi (es. $^{12}\text{C}=12$, $^1\text{H}=1$, $^{14}\text{N}=14$), quindi ioni con massa nominale uguale possono avere strutture completamente diverse (per es. lo ione a m/z 28 può essere dovuto a CO^+ , N_2^+ , CH_2N^+).

Per massa esatta di uno ione invece si considerano le masse esatte atomiche (es. $^{12}\text{C}=12$, $^1\text{H}=1.0078246$, $^{14}\text{N}=14.0030738$), perciò ioni con stessa massa nominale 249 ma con diversa composizione elementare avranno valori frazionari completamente differenti di massa esatta (es. $\text{C}_{20}\text{H}_9^+ = 249.0705$, $\text{C}_{19}\text{H}_7\text{N}^+ = 249.0579$, $\text{C}_{19}\text{H}_{21}^+ = 249.1644$).

2.2.1.3.4. Risoluzione necessaria per la separazione di un doppietto

Consideriamo due ioni con stessa massa nominale ma con differente massa esatta dovuta alla diversa composizione: $C_{19}H_7N^+$ (249.0579) e $C_{19}H_5O^+$ (249.0340).

La risoluzione necessaria alla loro separazione è:

$$R = m / \Delta m = 249 / (249.0579 - 249.0340) = 10418$$

Valori di risoluzione di questo livello possono essere ottenute con strumenti a doppia focalizzazione. L'alta risoluzione, quando accoppiata con un sistema cromatografico, viene utilizzata per effettuare misure quantitative ad alta specificità.

2.2.2. STRUMENTAZIONE IMPIEGATA

2.2.2.1. POWER PREP

Il metodo EPA 1613 prevede una complessa preparazione e purificazione del campione che è possibile semplificare con l'uso del Power Prep Fluid Management System (LabService), sistema di purificazione automatico costituito da tre differenti moduli che operano in parallelo il quale riduce drasticamente i tempi di analisi.

Il sistema di purificazione automatico Power Prep separa le PCDDs/PCDFs dai PCBs, nel caso in cui ne fosse richiesta l'analisi. Il sistema è costituito da colonne monouso per Power Prep in teflon contenenti silice multistrato, allumina o carbone attivo (Figura 2.7). La purezza del riempimento delle colonnine viene testata dalla casa produttrice prima del confezionamento sottovuoto. Vi sono inoltre cinque linee di carico solventi o miscele di solventi ultrapuri (N-Esano, Toluene, Etilacetato/Toluene 1/1, Diclorometano/N-Esano 1/1, Diclorometano all'8% in N-Esano) ed uno scarico, due linee di raccolta per ciascun modulo, ed un sistema di 8 valvole. Il tutto è gestito da pc dal software "DMS 6000".

La funzione delle varie colonnine e descrizione dei vari passaggi verrà descritta nel capitolo successivo nella parte sperimentale.

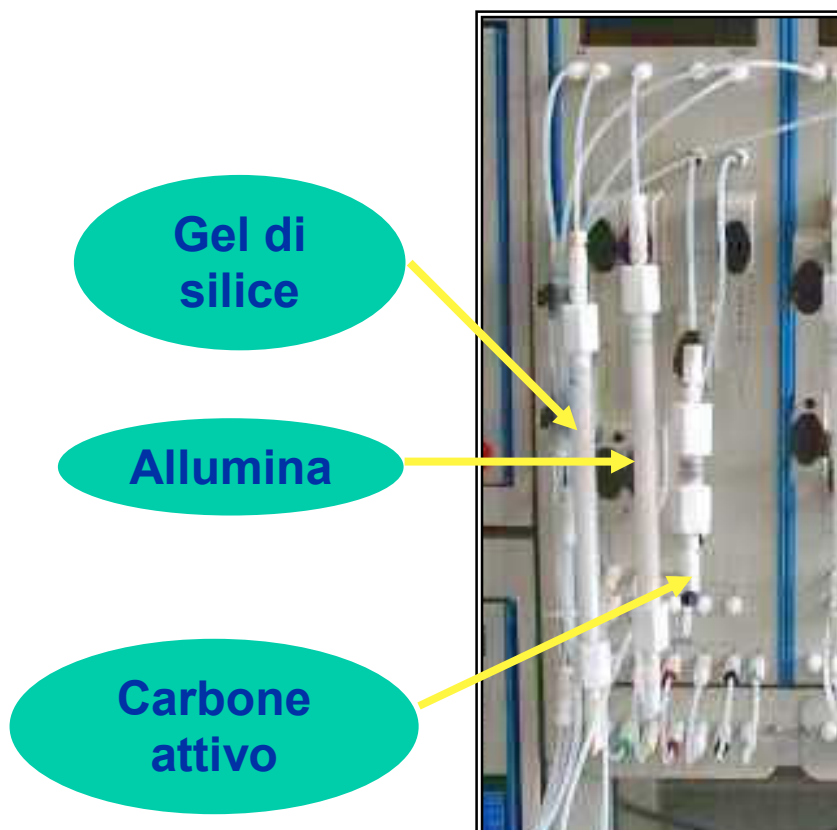


Figura 2.7: il Power Prep utilizza colonnine in teflon preimpaccate.

2.2.2.2.MAT 95 XP

2.2.2.2.1. Configurazione del sistema

Lo spettrometro di massa MAT 95 XP è uno strumento a doppia focalizzazione con geometria Nier-Johnson inversa (il settore magnetico precede quello elettrostatico).

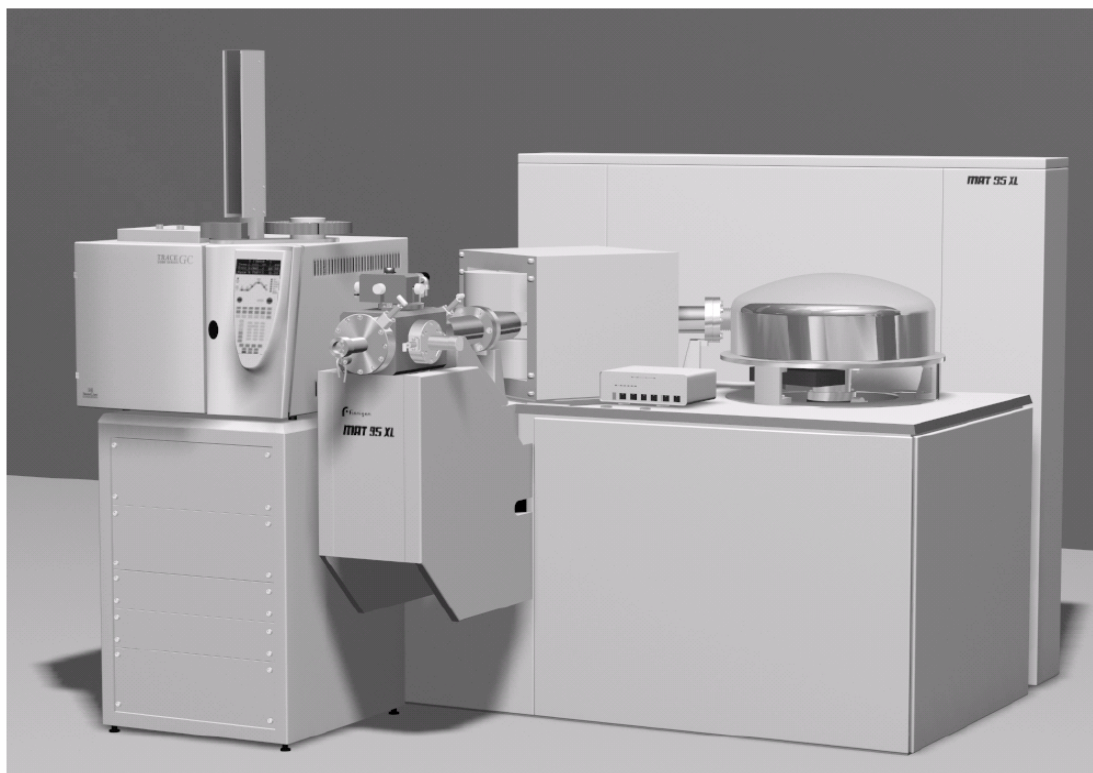


Figura 2.8: spettrometro di massa MAT 95 XP accoppiato con HRGC.

La Figura 2.8 e, nel dettaglio, la Figura 2.9 mostrano il sistema Mat 95 XP completo. Si osservano a partire da sinistra: il Gascromatografo, la testata della sorgente contenente la sorgente ionica, il sistema di vuoto ed il sistema di introduzione del gas di riferimento, seguono il settore magnetico ed il “cupolone” al cui interno sono collocati il settore elettrostatico ed il collettore di ioni.

Il sistema MAT 95 XP è controllato da un microprocessore (dotato di software ICL, Instrument Control Language) che comunica via cavo Ethernet con il sistema di elaborazione dei dati acquisiti (software Xcalibur). Tutti i collegamenti tra microprocessore ed operatore avvengono tramite PC con l'utilizzo del software Xcalibur. Tutte le parti sono pienamente integrate.

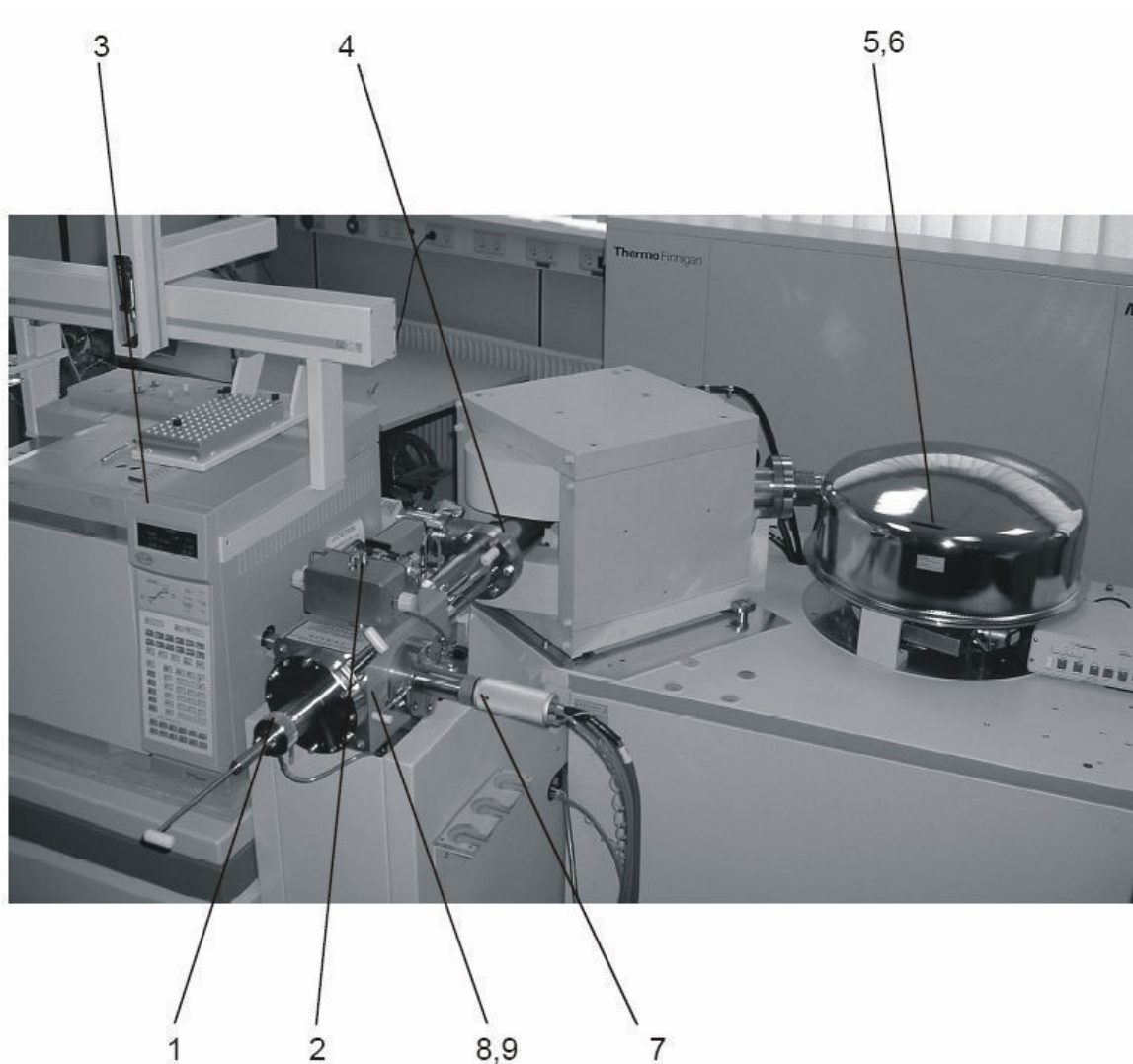


Figura 2.9: dettaglio del sistema MAT 95 XP.

- 1 – sonda per sostituire l'ion volume (blocco sorgente in cui avviene la ionizzazione elettronica)
- 2 – sistema di iniezione del gas di riferimento
- 3 – Gascromatografo
- 4 – settore magnetico
- 5, 6 – settore elettrico e collettore di ioni
- 7 – sistema di introduzione diretta in sorgente
- 8, 9 – testa dell'analizzatore con sorgente EI

2.2.2.2.2. Sistema del vuoto

Il pannello di controllo permette di visualizzare la situazione delle tre linee da vuoto: sorgente ionica, analizzatore, sistema di introduzione del gas di riferimento. Per regolare il vuoto di ogni linea vengono usate delle pompe da vuoto che permettono di raggiungere un vuoto dell'ordine di 10^{-2} mbar. La sorgente e l'analizzatore, per raggiungere le prestazioni richieste, devono operare in condizioni di alto vuoto e quindi il vuoto viene ulteriormente pompato da delle pompe turbomolecolari. La sorgente opera in vuoto dell'ordine di 10^{-5} mbar mentre l'analizzatore di 10^{-9} mbar.

2.2.2.2.3. Sorgente

Gli elettroni emessi dal filamento in tungsteno (W) sono accelerati e proiettati attraverso la camera di ionizzazione dal potenziale esistente tra il filamento e la sorgente ionica (voltaggio di accelerazione applicato, $U_a \sim 5000$ V). Vengono generalmente utilizzati elettroni con energie medie dell'ordine dei 70 eV.

Tutti i voltaggi e le correnti delle lenti (in realtà sono delle fenditure) sono impostati da PC dalla pagina di TUNE utilizzando i comandi ICL.

La pagina di TUNE serve per sintonizzare la sorgente ionica, per aggiustare la risoluzione, e per impostare tutti i parametri relativi al tune (voltaggi, correnti, temperature). La parte superiore della pagina di tune (vd. Figura 2.10) visualizza il diagramma schematico della sorgente.

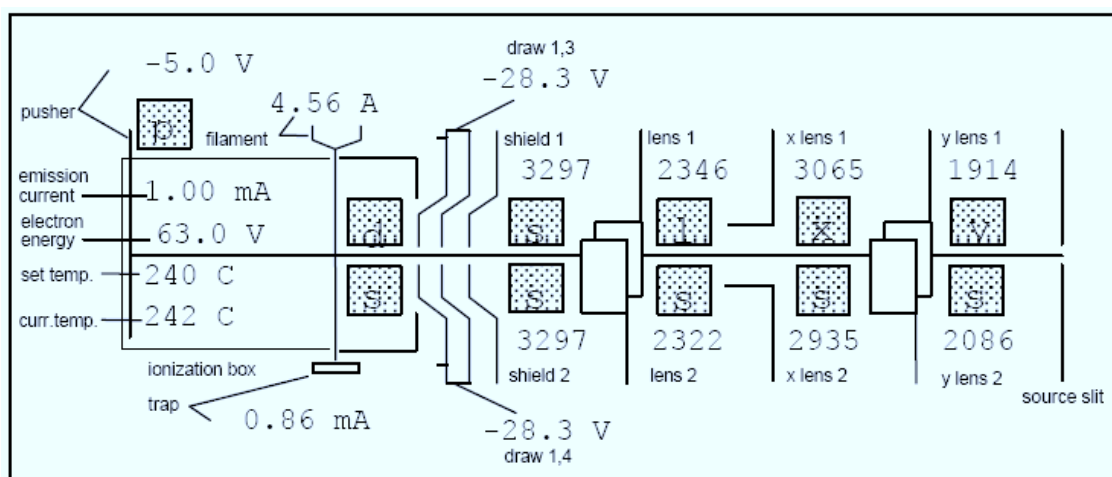


Figura 2.10: parametri della sorgente ionica nella pagina di TUNE.

2.2.2.2.4. Sistema di introduzione del gas di riferimento

La camera del gas di riferimento viene mantenuta a 150°C . Il gas di riferimento utilizzato è la perfluorotributilammina (FC43) e viene iniettato con una siringa attraverso un setto nella camera ogni volta che si utilizza lo strumento (ne bastano pochi μL).

Tramite un sistema di valvole e di pompaggio, il gas viene introdotto continuamente nel blocco sorgente attraverso una linea costituita da un capillare di silice fusa ricoperto da un tubo di rame che è in contatto termico con il blocco centrale riscaldato.

2.2.2.2.5. *Ottica*

Gli ioni sono generati nell'ion volume all'interno della sorgente ionica (vd. Figura 2.5). Gli ioni sono estratti dall'ion volume, focalizzati e accelerati dal sistema di lenti della sorgente ionica. In uscita dal sistema di lenti, gli ioni hanno guadagnato la piena energia ionica corrispondente al voltaggio di accelerazione applicato ($U_a \sim 5000$ V).

Gli ioni così generati entrano nell'analizzatore dalla "source o entrance slit" ed escono dalla "collector o exit slit" per poi venir rilevati dal detector.

La "source slit" e la "collector slit" sono geometricamente simili. L'ampiezza di entrambe le "slit" può essere elettricamente impostata a valori da 0 a 0,6 mm. Queste slit definiscono la risoluzione del sistema perciò la risoluzione desiderata è selezionata impostando l'ampiezza delle slit al valore opportuno. In più la "source slit" può venire ruotata manualmente per ottenere un preciso allineamento rettangolare rispetto al piano di deflessione del fascio. La collector slit invece non può venir ruotata manualmente allora si impiega un quadrupolo di rotazione del fascio prima della "collector slit" che permette così di allineare il fascio e di ottenere la massima risoluzione e la miglior forma dei picchi.

Tra le due slit di entrata e di uscita del fascio ionico, si trovano i componenti principali dell'analizzatore che sono il settore magnetico seguito dal settore elettrico. Tra i vari elementi, in particolare si evidenzia la presenza di due quadrupoli: focusing quad (FQUAD) dopo la "source slit" e beam rotation (BQUAD) quad prima della "collector slit", che permettono in fase di tuning di ottimizzare la risoluzione (Figura 2.11).

EI	POS		magnetic
U(a)	4757 V	□ u	U(esa) 763.8 V
Entr. Slit	(ENS)		330.0
Exit Slit	(EXS)		262.0
Sweep Mass	(MASS)		263.98 amu
Virt. Mass	(VMASS)		263.98 amu
Link Mass	(LMASS)		263.98 amu
Sweep Width	(SW)		0.50 %
Sweep Speed	(SS)		3.0 /s
U(a) Offset	(UOFS)		2.0 V
U(a)/U(esa)	(URATIO)		2.105 %
Multiplier	(EMULT)		1.50 kV
Dyn. Volt.	(DYNODE)	pos	
Ref. Inlet	(TREF)	150	C
Beam Rot.	(BQUAD)	0.0	V
Focus Quad	(FQUAD)	5.5	V

Figura 2.11: altri parametri visibili dalla pagina di TUNE.

2.2.2.2.6. Settore Magnetico

Il magnete ha un angolo di curvatura di 65° , calcolato in base alla risoluzione che si vuole ottenere ($R = 10.000$), ed il raggio del percorso nominale medio degli ioni è di 350 mm. L'intensità del campo magnetico può essere impostata al massimo al valore di circa 1.5 Tesla. Il campo magnetico è generato da un elettromagnete chiuso il cui peso è molto elevato: 440 kg.

2.2.2.2.7. Settore Elettrico (ESA)

Il campo elettrico è generato da un condensatore elettrico cilindrico. Per forzare gli ioni nel percorso circolare principale, deve essere applicato al condensatore elettrico il voltaggio di deflessione U_{esa} . Questo voltaggio di deflessione è internamente calcolato e generato dal processore di controllo della deflessione.

Di solito per normali operazioni, per esempio per ioni stabili, il voltaggio di accelerazione (U_a) è accoppiato con il voltaggio di deflessione degli ioni (U_{esa}). Il rapporto dei due voltaggi U_a / U_{esa} , detto URATIO, viene anch'esso impostato automaticamente in fase di tuning al valore tale da permettere a tutti gli ioni di energia ionica selezionata di attraversare il settore elettrostatico.

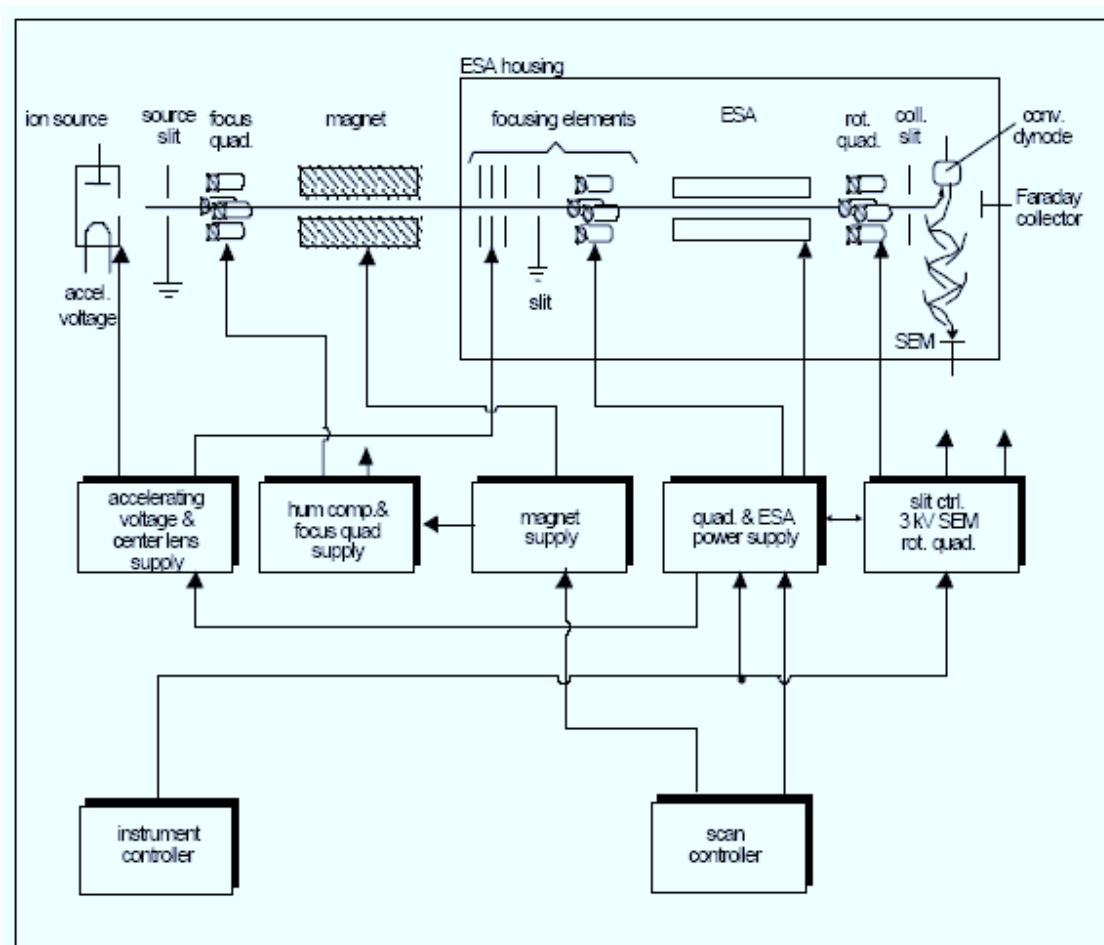


Figura 2.12: settore elettrico e sue connessioni.

2.2.2.2.8. Rivelazione di Ioni

2.2.2.2.8.1.SEM

Infine, all'uscita della "collector slit", gli ioni sono deflessi al dinodo di conversione. Le particelle generate durante la conversione (elettroni secondari da ioni positivi – ioni positivi da ioni negativi) sono accelerate verso il primo dinodo dell'elettromoltiplicatore secondario (SEM) e amplificate passando da un dinodo a quello successivo (17 dinodi in totale).

Dopo aver attraversato il settore elettrostatico (ESA), gli ioni sono convertiti dal dinodo di conversione in elettroni. La corrente elettronica risultante è amplificata da un elettromoltiplicatore secondario (SEM).

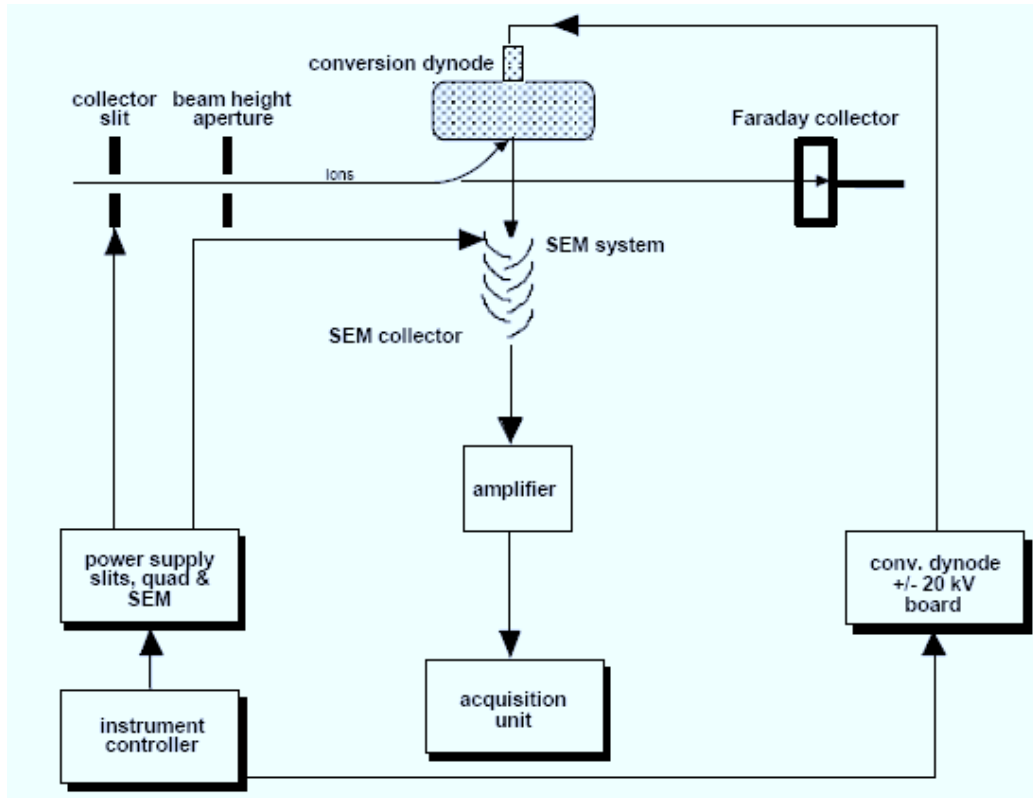


Figura 2.13: Sistema rivelatore-dinodo di conversione.

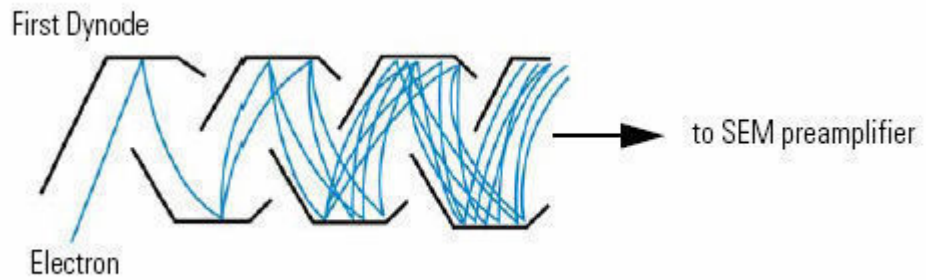


Figura 2.14: principio del processo a cascata all'interno dell'elettromoltiplicatore.

2.2.2.2.9. MID (*Multiple Ion Detection*)

Il MID è un metodo di analisi che permette di selezionare varie masse discrete. Le correnti ioniche di queste masse sono misurate separatamente e registrate quasi in continuo.

L'obiettivo del MID è quello di misurare composti con le migliori sensibilità e precisione possibili.

L'alta risoluzione in combinazione con il MID ha il vantaggio di eliminare il rumore di fondo chimico della stessa massa nominale ma differente massa esatta e perciò di aumentare rispettivamente il rapporto segnale/rumore e la sensibilità.

La modalità di lavoro utilizzata per l'analisi delle diossine è quella di "LOCK MODE".

In "LOCK MODE" per ciascuna finestra di tempo (vd. par. 3.4 Analisi Strumentale), deve essere definita una Lock mass e può essere definita una Cali mass, che vengono scelte tra le masse caratteristiche del gas di riferimento (FC43) che viene introdotto in maniera permanente nella sorgente.

In questa modalità, vengono effettuati salti elettrici dalla posizione del picco selezionato a quella del picco successivo. Lo strumento esegue una misura periodica delle Lock mass e Cali mass in modo tale che lo strumento sia sempre sotto controllo.

Il MID in modalità LOCK funziona in modo tale che il magnete si fissa in una posizione che corrisponde ad una massa sotto la prima massa della finestra considerata. Poi il sistema salta elettricamente sulla Lock mass dove vengono eseguite delle microscansioni per trovare il centro del picco. Fino a che il sistema non ha identificato la Lock mass, il sistema rimane bloccato su tale posizione. Dopodiché il sistema salta sulla Cali mass ed opera lo stesso procedimento.

Con le informazioni ricavate dalle Lock e Cali mass si ottiene la calibrazione elettrica del sistema. Al termine, il sistema inizia a saltare da massa a massa in base alle masse esatte selezionate per quella determinata finestra. Il sistema per così dire si parcheggia sulle differenti posizioni e colleziona i dati acquisiti per un intervallo di tempo predefinito. Per assicurare che la misura avvenga in corrispondenza del massimo del picco, i valori delle masse vanno inseriti con quattro cifre decimali.

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1. RETE DI MONITORAGGIO

Le stazioni sono riconducibili a quattro tipologie a seconda della distanza dalla foce ed ai requisiti di legge:

- *stazioni di foce*: situate in prossimità delle foci dei corpi idrici nella laguna di Venezia (importanti prioritariamente per la definizione dello stato di qualità ambientale dei corpi idrici secondo il D.Lgs 152/06 - ex DL 152/99, degli obiettivi di qualità e dei carichi massimi ammissibili secondo il Decreto Ronchi-Costa);
- *stazioni intermedie*: posizionate lungo l'asta dei corpi idrici o a chiusura di sottobacini idrografici;
- *stazioni di sorgente*: situate in prossimità delle zone di risorgiva dei corpi idrici della parte settentrionale del Bacino Scolante;
- *stazioni complementari* importanti prioritariamente per la definizione dello stato di qualità ambientale e la caratterizzazione dei corsi d'acqua per l'uso irriguo e per la vita dei pesci.

Le stazioni del monitoraggio nel territorio del Bacino Scolante interessate dall'analisi delle diossine sono quelle di foce, in totale 10, le quali sono elencate nella tabella seguente e rappresentate in cartina (Figura 3.1).

Bacino Idrografico	Codice stazioni di foce	Corso idrico	Località	Comune (Provincia)	Distanza dalla foce (km)
Dese	143	Fiume Zero	Poian	Quarto d'Altino (VE)	8,7
Dese	481	Fiume Dese	Dese	Marcon (VE)	10,8
Naviglio Brenta	137	Naviglio Brenta	Malcontenta	Mira (VE)	5,4
Naviglio Brenta	504	Canale Nuovissimo	Lova	Campagna Lupia (VE)	11
Marzenego	489	Fiume Marzenego-Osellino	Mestre V.le Vespucci	Venezia	1,5
Marzenego	491	Canale Scolmatore	Tessera	Venezia	0,4
Bonifica Adige Bacchiglione	492	Canale delle Trezze	Grezze	Chioggia (VE)	0,6
Lusore	490	Scolo Lusore	Marghera	Venezia	1,5
Fiumicello (VI Presa)	179	Scolo Fiumazzo	Lova	Campagna Lupia (VE)	0,6
Altipiano Schilla	182	Canale Scarico	Conche	Codevigo (PD)	4,3

Tabella 3.1: ubicazione delle stazioni di foce del Bacino Scolante.

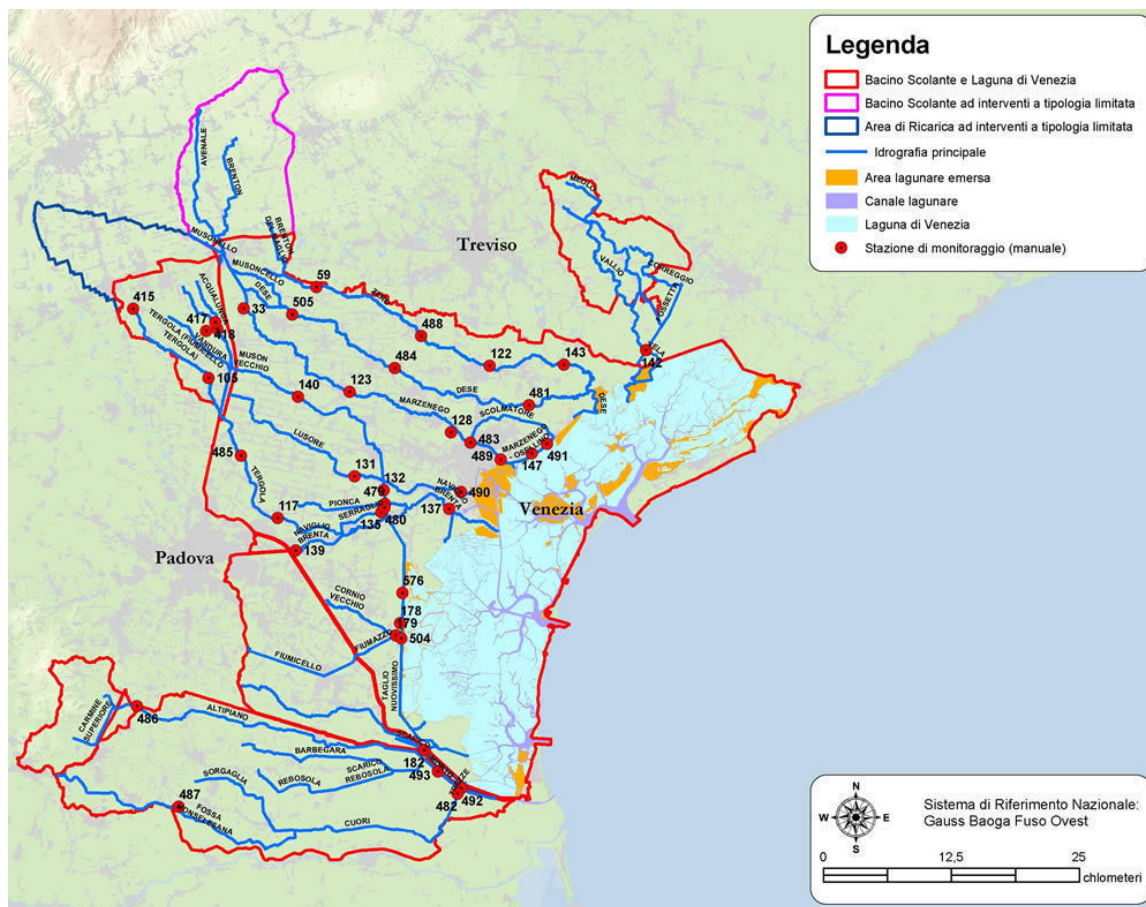


Figura 3.1: rappresentazione delle stazioni di monitoraggio del Bacino Scolante (stazioni di foce: **143** - Fiume Zero; **481** - Fiume Dese; **137** - Naviglio Brenta; **504** - Canale Nuovissimo; **489** - Fiume Marzenego-Osellino; **491** - Canale Scolmatore; **492** - Canale delle Trezze; **490** - Scolo Lusore; **179** - Scolo Fiumazzo; **182** - Canale Scarico).

3.2. METODI DI CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Le date di prelievo vengono stabilite in accordo con il Magistrato alle Acque di Venezia ed i prelievi vengono effettuati in condizioni di “quadratura” di marea (quando la marea è debole, non è né alta né bassa), al fine di rendere minima la variabilità indotta dalle escursioni mareali. I campionamenti vengono eseguiti sui primi 50 cm della colonna d’acqua, sezione più rappresentativa per valutare l’influenza delle sorgenti di inquinanti di tipo urbano ed industriale sull’ambiente, in particolare nelle zone molto prossime alla laguna.

Per i microinquinanti come le diossine, la frequenza di campionamento è semestrale.

I campioni d’acqua raccolti nel corso di ciascuna campagna sono stati suddivisi in bottiglie silanizzate da 4 L.

Tutti i campioni prelevati sono stati conservati a + 4 °C e al buio fino al momento dell’analisi.

3.3. MATERIALI E METODI

Nell’applicazione del Metodo EPA 1613B/94 è stata introdotta una modifica non sostanziale: la purificazione dell’estratto utilizzando il sistema automatico Power Prep. L’utilizzo di questa attrezzatura comporta una riduzione dei tempi di analisi ed una maggiore riproducibilità minimizzando l’effetto operatore.

3.3.1. PROCEDIMENTO

Dal campione viene separata un’aliquota sufficiente per l’analisi a cui verranno aggiunti gli standard di estrazione o di processo, dopodichè si potrà proseguire con la fase di estrazione.

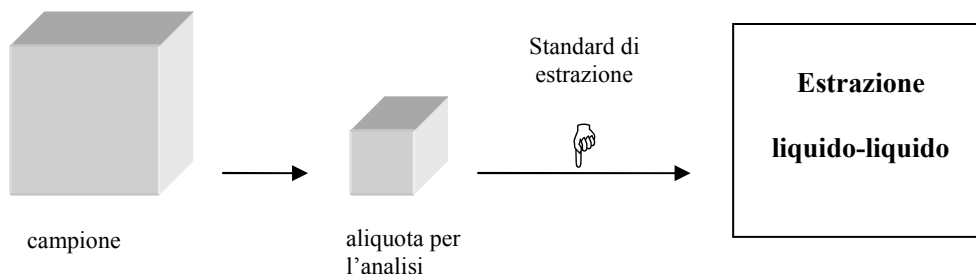


Figura 3.2: fase iniziale del procedimento.

Nel seguente schema a blocchi vengono riassunte nello specifico le fasi a cui viene sottoposta una matrice acquosa:

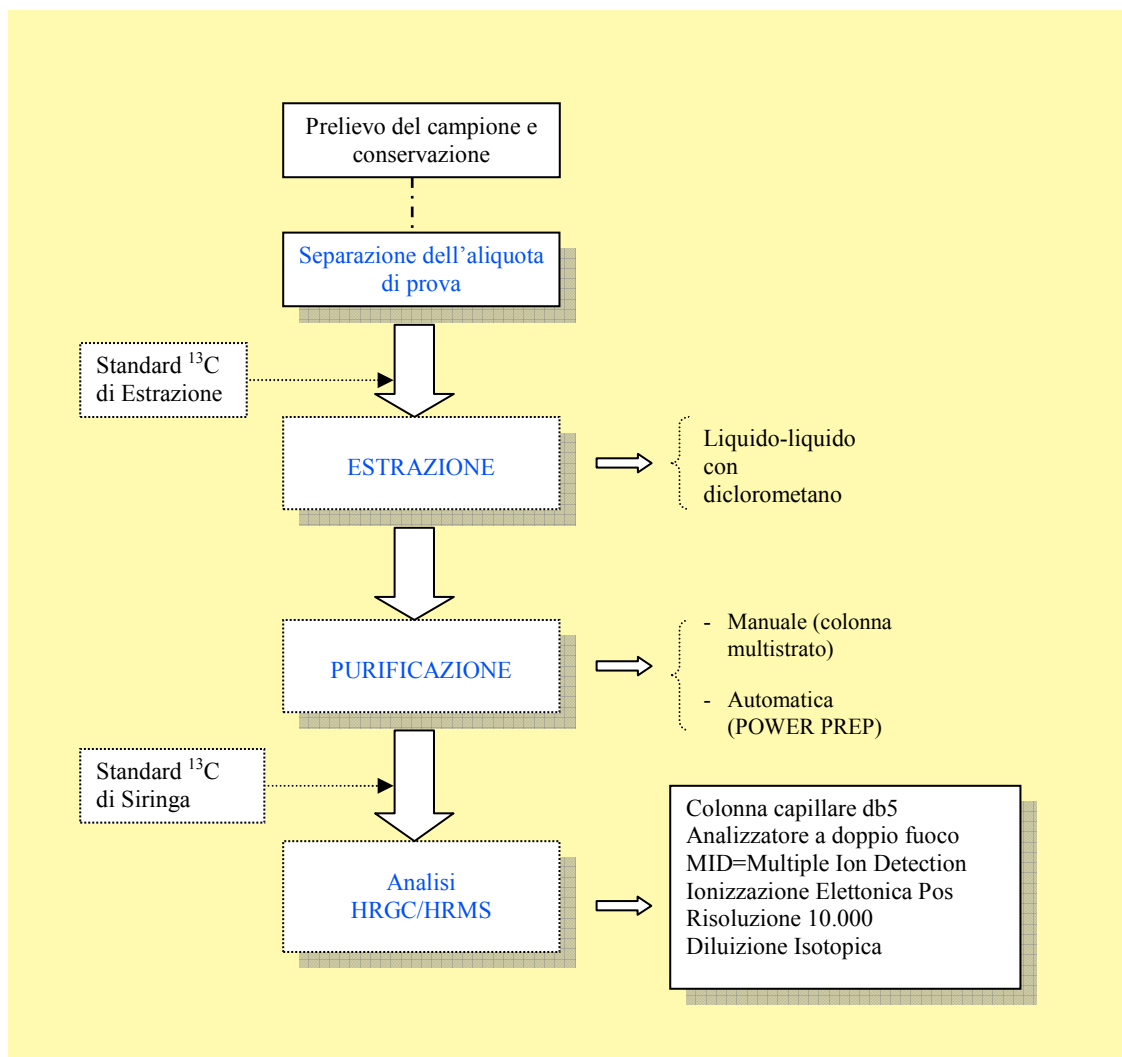


Figura 3.3: schema a blocchi del trattamento e analisi di un campione d'acqua.

3.3.2. SOLUZIONI STANDARD

Le miscele di standard impiegate sono certificate e con un grado di purezza per lo più del 99 %. Le miscele vengono conservate in freezer.

3.3.2.1. STANDARD MARCATI DI ESTRAZIONE

La soluzione di lavoro di standard marcati di estrazione, DIOX EXTRA, viene ottenuta per diluizione di una miscela madre EDF-8999. Le concentrazioni sono riportate nella tabella 3.2.

Componente	EDF-8999 Conc. (ng/mL)	Purezza	DIOX EXTRA Conc. (ng/mL)
2,3,7,8 Tetra-CDD ¹³ C ₁₂	100.00	99 %	0.5
1,2,3,7,8 Penta-CDD ¹³ C ₁₂	100.00	99 %	0.5
1,2,3,4,7,8/ 1,2,3,6,7,8 Esa-CDD ¹³ C ₁₂	200.00	97 %/99 %	1.0
1,2,3,4,6,7,8 Epta-CDD ¹³ C ₁₂	100.00	99 %	0.5
Octa-CDD ¹³ C ₁₂	200.00	98 %	1.0
2,3,7,8 Tetra-CDF ¹³ C ₁₂	100.00	99 %	0.5
1,2,3,7,8 Penta-CDF ¹³ C ₁₂	100.00	99 %	0.5
2,3,4,7,8 Penta-CDF ¹³ C ₁₂	100.00	97 %	0.5
1,2,3,4,7,8 Esa-CDF ¹³ C ₁₂	100.00	99 %	0.5
1,2,3,6,7,8 Esa-CDF ¹³ C ₁₂	100.00	99 %	0.5
1,2,3,7,8,9 Esa-CDF ¹³ C ₁₂	100.00	98 %	0.5
2,3,4,6,7,8 Esa-CDF ¹³ C ₁₂	100.00	98 %	0.5
1,2,3,4,6,7,8 Epta-CDF ¹³ C ₁₂	100.00	99 %	0.5
1,2,3,4,7,8,9 Epta-CDF ¹³ C ₁₂	100.00	97 %	0.5

Tabella 3.2 : composizione della miscela madre EDF-8999 e della soluzione di lavoro di standard marcati di estrazione, DIOX EXTRA.

3.3.2.2. STANDARD INTERNO DI SIRINGA

La soluzione di lavoro di standard marcati di siringa, DIOX SIR, si ottiene per diluizione di una miscela madre ED-2521. Le concentrazioni sono riportate nella tabella 3.3:

Componente	ED-2521 Conc. (ng/μL)	Purezza	DIOX SIR Conc. (ng/μL)
1,2,3,4 Tetra-CDD ¹³ C ₁₂	5.00	99 %	0.5
1,2,3,7,8,9, Esa-CDD ¹³ C ₁₂	5.00	99 %	0.5

Tabella 3.3: composizione della miscela madre ED-2521 e soluzione di lavoro di standard marcati di siringa, DIOX SIR.

3.3.3. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Se il pH del campione acquoso è basico (pH > 9), l'acqua viene acidificata con qualche mL di HCl 1 M fino a portare il pH a valori compresi tra 7 e 9.

L'aliquota per l'analisi deve essere rappresentativa dell'intero campione quindi la bottiglia va agitata in modo da omogeneizzare il campione.

L'analisi viene eseguita sulla frazione totale, cioè sulla frazione disciolta sommata al particolato sospeso (vd. par. 1.3.6 Normativa).

Si preleva un'aliquota di prova di 2 L utilizzando un cilindro graduato da 2L, agitando due o tre volte la bottiglia durante l'operazione di travaso.

L'aliquota viene trasferita in imbuto separatore per la successiva fase di estrazione liquido-liquido.

Se invece il campione contiene particelle solide in percentuale superiore all'1%, esso viene filtrato su di un filtro in fibra di vetro. Il filtro è poi estratto in ASE (Accelerated Solvent Extractor) e l'estratto viene successivamente unificato all'estratto ottenuto dall'estrazione liquido-liquido della frazione liquida.

3.3.4. ESTRAZIONE LIQUIDO-LIQUIDO

L'aliquota di prova del campione già travasata nell'imbuto separatore, viene contaminata con 1 mL di soluzione di lavoro Diox Extra (standard di processo), omogeneizzata e lasciata riposare per qualche minuto.

Si inizia l'estrazione con 100 mL di diclorometano agitando per 2 minuti. Quando si sono separate le due fasi acquosa ed organica, quest'ultima viene raccolta filtrandola attraverso sodio solfato anidro.

Se si forma emulsione all'interfase, dovuta alla presenza di alghe ed impurezze, si separa l'emulsione in una provetta da centrifuga e si centrifuga l'estratto emulsionato dopodichè si recupera la fase organica sottostante facendola passare sempre attraverso il sodio solfato anidro e riunendola così con l'estratto. La parte di emulsione rimasta viene trasferita nell'imbuto separatore.

Si eseguono altre due estrazioni con 50 mL di diclorometano ciascuna.

L'estratto raccolto in un tubo per il turbovap (apparecchio per concentrare sotto corrente di azoto e bagno termostato) viene concentrato ($T = 40^{\circ}\text{C}$, $P \sim 0.6 \text{ bar}$) e portato a piccolo volume (ca. 1 mL).

3.3.5. PURIFICAZIONE

3.3.5.1. PURIFICAZIONE MANUALE

La purificazione viene eseguita mediante cromatografia su colonna multistrato. Viene impiegata ogni qualvolta nel campione sia presente un carico organico dovuto a residui di alghe o altro come spesso succede nelle acque superficiali.

La colonna multistrato, che verrà chiamata *acida*, viene preparata ed impaccata come segue (stratigrafia dal basso verso l'alto): lana di vetro o setto poroso in vetro, una spatolata di Na_2SO_4 anidro, 3 gr di gel di silice; a rubinetto chiuso, si riempie la colonnina con n-esano fino a sotto il sebatoio e si percuote leggermente per far uscire le bolle d'aria formati nella silice; 10 gr di extrelut miscelati con 20 gr di acido solforico concentrato, 2 gr di extrelut miscelati con 1 gr di acido solforico concentrato, 3 gr di gel di silice e una spatolata di Na_2SO_4 anidro (Figura 3.4).

La colonna viene impaccata bene dopo l'aggiunta di ciascuno strato. Si apre il rubinetto in modo da eluire il solvente in eccesso fino in testa alla colonna.

La colonna viene condizionata con 30-40 mL di n-esano avendo cura che la colonnina resti sempre ricoperta di solvente.

Si trasferisce quantitativamente in testa alla colonna l'estratto concentrato lavando il tubo da cui è stato trasferito il campione con 3 lavaggi da ca. 0.5-1 mL di n-esano e si inizia l'eluizione cromatografica. Far eluire con 150 mL di n-esano.

L'estratto purificato viene raccolto e concentrato a piccolo volume (1 mL) con Turbovap ($T = 40^{\circ}\text{C}$, $P \sim 0.6$ bar).

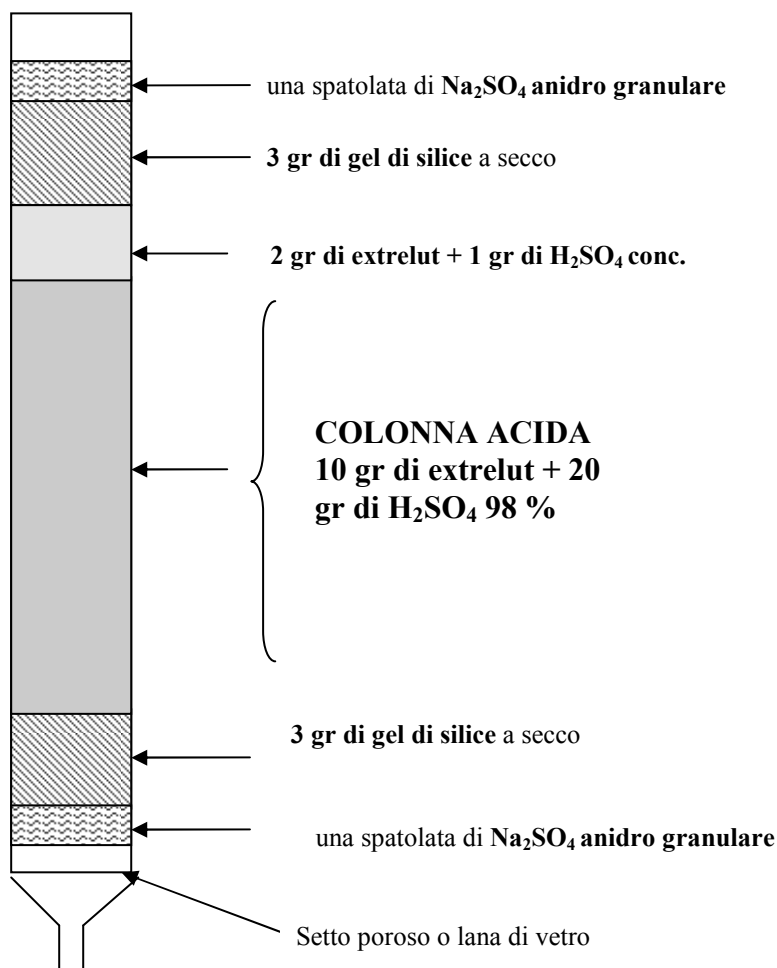


Figura 3.4: stratigrafia di una colonnina di purificazione multistrato o *acida*.

3.3.5.2. PURIFICAZIONE AUTOMATICA

L'eluato concentrato proveniente dalla colonna *acida* viene ulteriormente purificato col Power Prep.

Il sistema di purificazione automatico Power Prep separa le PCDDs/PCDFs dai PCBs nel caso in cui ne fosse richiesta l'analisi.

La colonnina silica multistrato (ABN=acido-base-neutra) serve per eliminare interferenti e grassi.

La colonnina in allumina trattiene PCDD/F e PCB che vengono poi eluiti in modo differenziale variando i solventi e le loro percentuali (eluizione PCB: diclorometano all'8% in n-esano; eluizione PCDD/F: n-esano/diclorometano 1:1).

Mentre la colonna multistrato e la colonna di allumina lavorano per polarità, la colonna in carbone grafítico agisce per affinità fisica in base alla planarità delle molecole.

Le diossine dopo essere state trattenute dall'allumina in n-esano, vengono eluite con la miscela diclorometano/n-esano 1:1 e si fermano nella colonnina di carbone, dopodichè si cambia il solvente a toluene/etilacetato 1:1 che serve alla purificazione di ulteriori eventuali interferenti e concentrazione delle diossine.

[Polarità crescente dei solventi: n-esano (2) toluene (2.4) etilacetato (6) DCM (9.1) es. acetone polare (21)]

Si ritorna in situazione apolare cambiando il solvente prima ad n-esano e poi a toluene col quale si ottengono percentuali superiori di recupero.

Inizialmente le colonnine vengono condizionate utilizzando il seguente programma:

Condizionamento colonne

Step	Flow (mL/min)	Vol (mL)	M1-M8	descrizione
1	10.0000	20.0000	01222226	carica esano
2	10.0000	30.0000	01212226	bagna allumina
3	10.0000	20.0000	01221226	bagna carbone
4	10.0000	60.0000	01122226	bagna silice
5	1.00000	0.10000	00000000	spegni le valvole

Il campione concentrato viene introdotto direttamente in colonna di silice mediante siringa monouso con filtro. Dopo il trasferimento del campione, si avvia il programma vero e proprio di purificazione:

Diossine_pcb

Step	Flow (mL/min)	Vol (mL)	M1-M8	Descrizione
1	10.0000	10.0000	01222006	Carica Esano
2	5.00000	80.0000	01111116	Eluizione Esano
3	10.0000	12.0000	02222006	Cambio al 8% DCM
4	10.0000	140.000	02212001	Eluizione PCB al 8% DCM
5	10.0000	12.0000	03222006	Cambio al 50% DCM
6	5.00000	160.000	03211116	Eluiz allumina al 50% DCM
7	10.0000	12.0000	04222006	Cambio Et.Ac / Toluene
8	4.00000	4.00000	04221116	Eluizione Et.Ac / Toluene
9	10.0000	12.0000	01222006	Cambia Esano
10	10.0000	10.0000	01221116	Eluisci con Esano
11	10.0000	12.0000	05222006	Cambia a Toluene
12	5.00000	40.0000	05221222	Eluizione diossine con Toluene
13	5.00000	2.00000	01221222	Purge
14	1.00000	0.10000	00000000	Spegni Valvole

La frazione di diossine/furani in toluene viene concentrata a piccolo volume (< 50 µL), senza mai andare a secco, in turbovap (T = 50°C, P ~ 0.6 bar).

Infine il campione concentrato viene trasferito in vial con inserto conico silanizzato da 200 µL facendo almeno tre lavaggi con qualche goccia di n-esano.

Se l'analisi non viene eseguita immediatamente, l'estratto purificato si può conservare a piccolo volume in freezer.

Altrimenti si porta a secco sotto lieve corrente di azoto con l'utilizzo di capillari in metallo.

Infine si riprende con 10 µL di soluzione di lavoro di standard di siringa, DIOX SIR, per l'analisi strumentale.

3.4. ANALISI STRUMENTALE

L'analisi di Diossine e Furani viene effettuata tramite GC/MS ad alta risoluzione con analizzatore a doppio fuoco (settore magnetico seguito da settore elettrostatico) della Thermo Electron Corporation.

3.4.1. PARAMETRI STRUMENTALI

3.4.1.1. CONDIZIONI OPERATIVE DELL'AUTOCAMPIONATORE

Volume di iniezione: 1 µL in modalità "sandwich", cioè con un cuscinetto d'aria prima e dopo il prelievo del campione.

Piattaforma autocampionatore termostata a 18 °C.

Per evitare contaminazioni e trascinamenti, prima dell'iniezione non vengono fatti avvinnamenti della siringa ma solo alcuni lavaggi con toluene, mentre dopo l'iniezione vengono effettuati ripetuti lavaggi (anche 10 per ciascun solvente) con solventi a diverse polarità (metanolo, acetone, n-nonano, toluene).

3.4.1.2. CONDIZIONI OPERATIVE DEL GASCROMATOGRAFO

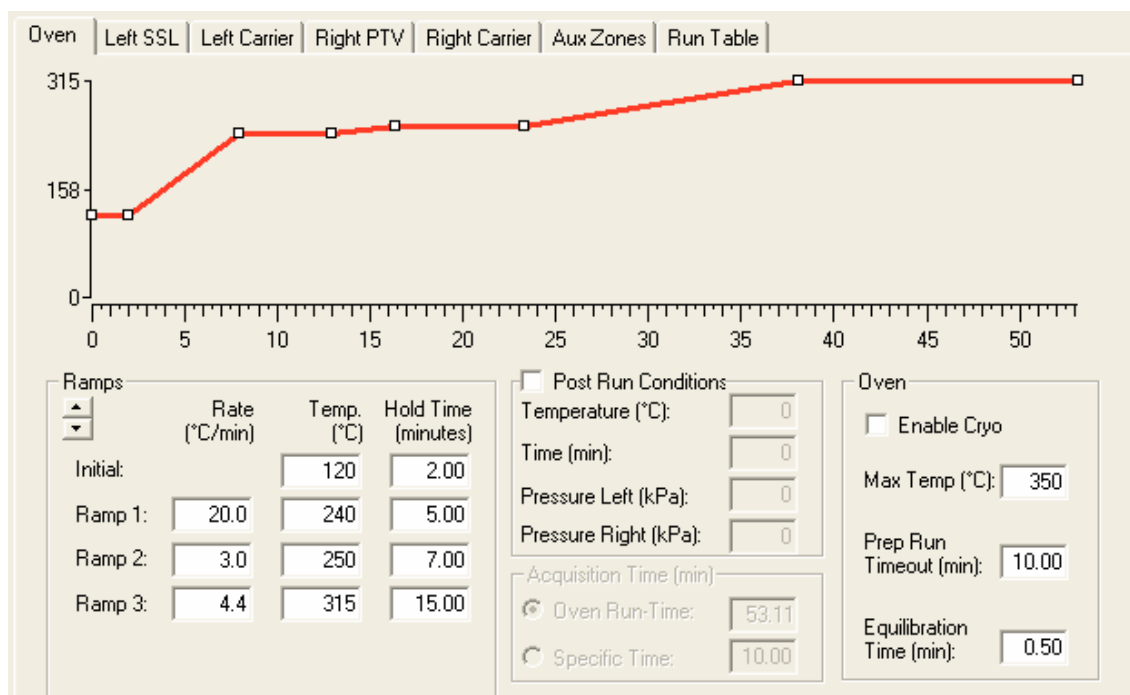
Tipo di iniezione	PTV in modalità Splitless
Flusso gas di trasporto (He)	1 mL/min in modalità <i>constant flow</i>
Colonna capillare	colonna capillare DB-5MS (apolare in fase legata) 5% fenil 95% metilpolisilossano; lunghezza nominale 60 m, i.d. = 0.25 mm, film = 0.25 µm
Temperature interfaccia (Transfer Line)	290 °C

Programma dell'iniettore PTV (Programmed Temperature Vaporization):

Split flow:	50 mL/min
Splitless time:	1.50 min
Clean flow:	150 mL/min

T iniziale:	42 °C
Velocità rampa 1:	14.5 °C/sec
T finale:	280 °C per 3 min
Velocità rampa 2 (cleaning):	8.0 °C/sec
T finale:	320 per 5 min

Programma di Temperatura del forno



3.4.1.3. CONDIZIONI OPERATIVE DELLO SPETTROMETRO DI MASSA

T sorgente: 290 °C

Gas di riferimento: Perfluorotributilammina (FC43) che fluisce in continuo all'interno della sorgente durante l'analisi in modo da operare una calibrazione continua delle masse da monitorare.

T camera del gas di riferimento: 150 °C

Risoluzione ≥ 10.000

Modalità di MID (Multiple Ion Detection): LOCK

Modalità di Acquisizione: Cent

Ciascun congenere viene rivelato registrando due frammenti molecolari prescelti, sia per i congeneri nativi che per quelli marcati con $^{13}\text{C}_{12}$ (vd. Tabella 3.4).

Gli ioni da analizzare sono divisi in cinque gruppi corrispondenti alle cinque famiglie di diossine e furani.

Congenere/Segmento	Nativo m/z 1	Nativo m/z 2	Rapporto isotopico	Marcato m/z 1	Marcato m/z 2
da 15.0 a 22.5 min *					
Tetra-CDD	319.8965	321.8936	0.77	331.9368	333.9339
Tetra-CDF	303.9016	305.8987	0.77	315.9419	317.9389
FC43	Lock	313.9839		Cali	363.9810
da 22.5 a 27.8 min *					
Penta-CDD	355.8546	357.8517	0.66	367.8949	369.8919
Penta-CDF	339.8597	341.8568	0.66	351.9000	353.8970
FC43	Lock	313.9839		Cali	363.9810
da 27.8 a 33.5 min *					
Esa-CDD	389.8156	391.8127	0.82	401.8559	403.8530
Esa-CDF	373.8207	375.8178	0.82	387.8580	385.8610
FC43	Lock	375.9810		Cali	413.9780
da 33.5 a 37.5 min *					
Epta-CDD	423.7767	425.7737	0.98	435.8169	437.8140
Epta-CDF	407.7818	409.7788	0.98	421.8190	419.8220
FC43	Lock	413.9780		Cali	463.9740
da 37.5 a 50.0 min *					
Octa-CDD	457.7377	459.7348	0.88	469.7780	471.7750
Octa-CDF	441.7428	443.7398	0.88		
FC43	Lock	425.9770		Cali	463.9740

*i valori sono indicativi e devono essere aggiornati ad ogni manutenzione delle colonna cromatografica

Tabella 3.4: Masse esatte monitorate.

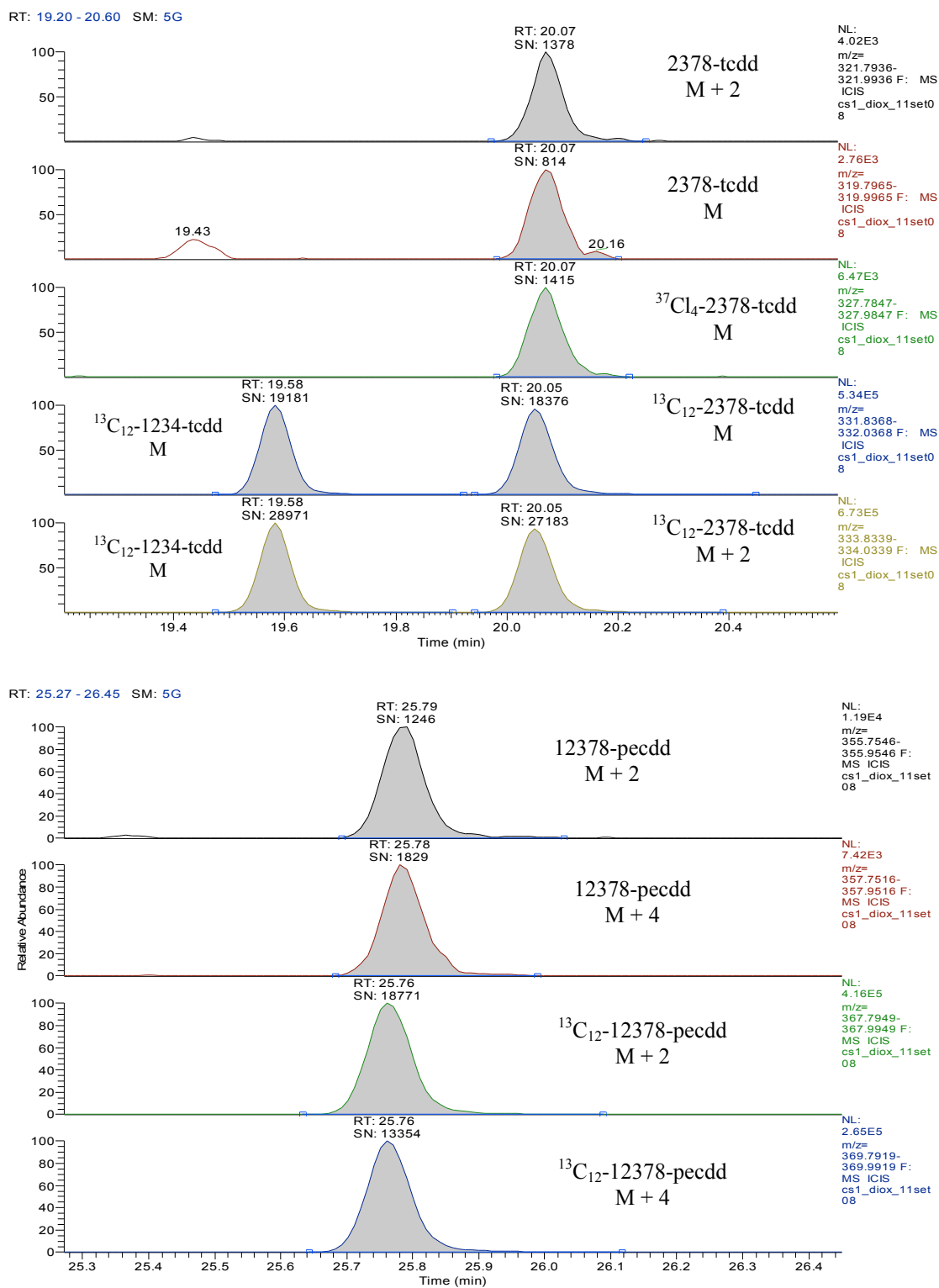
3.5. IDENTIFICAZIONE

3.5.1. REQUISITI PER L'IDENTIFICAZIONE

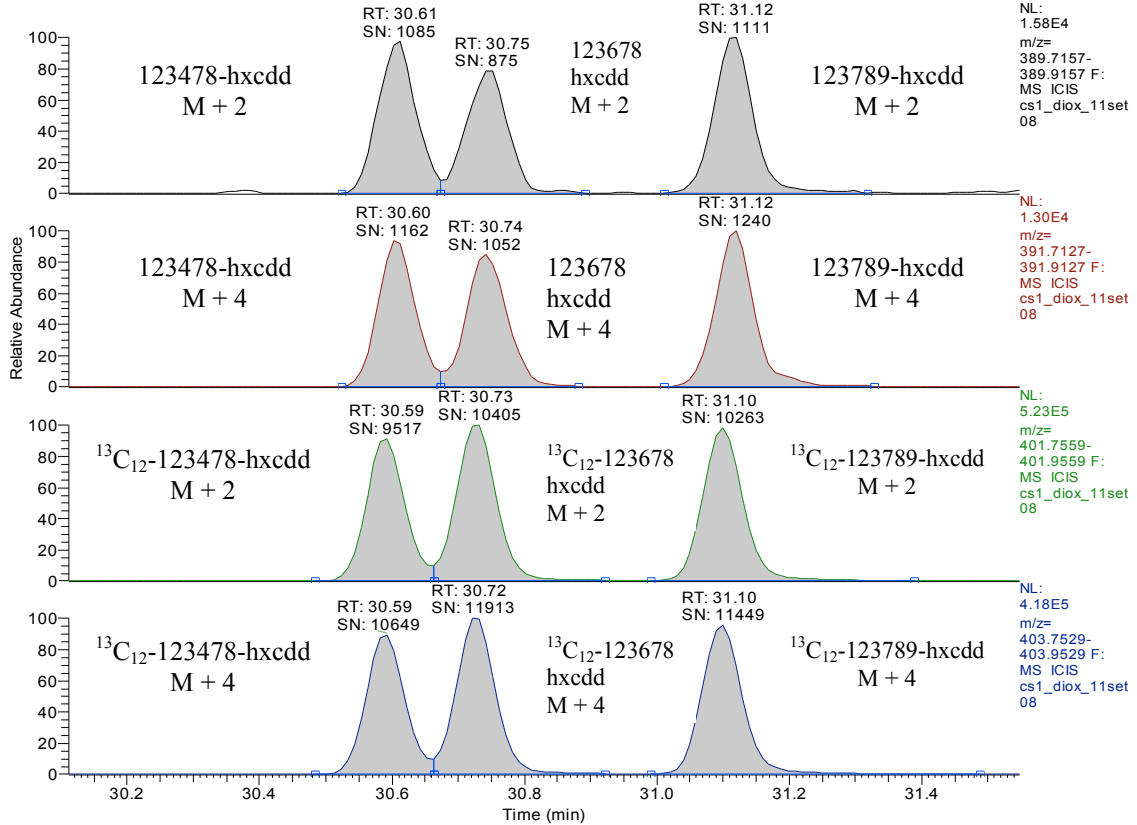
L'identificazione di un congenere è considerata positiva nel caso in cui vengano soddisfatti i seguenti requisiti:

- risponda ai relativi ioni di massa molecolari monitorati (Tabella 3.4);
- il rapporto segnale/rumore (S/N) per il picco cromatografico di ciascuna massa esatta sia ≥ 2.5 per ciascun congenere rilevato nell'estratto del campione, e ≥ 10 per le diossine/furani negli standard di taratura;
- soddisfi al rapporto di abbondanza ionica tra i due ioni monitorati. Il rapporto isotopico tra gli ioni misurati corrisponde al valore che si registra (quindi all'area sottesa dal picco) nell'iniezione di un livello qualsiasi di standard $\pm 15\%$. Il rapporto isotopico calcolato va confrontato con quello teorico dato in tabella 3.4;
- la differenza tra il tempo di ritenzione del composto nativo ed il rispettivo composto marcato sia al massimo di 0.03 min.

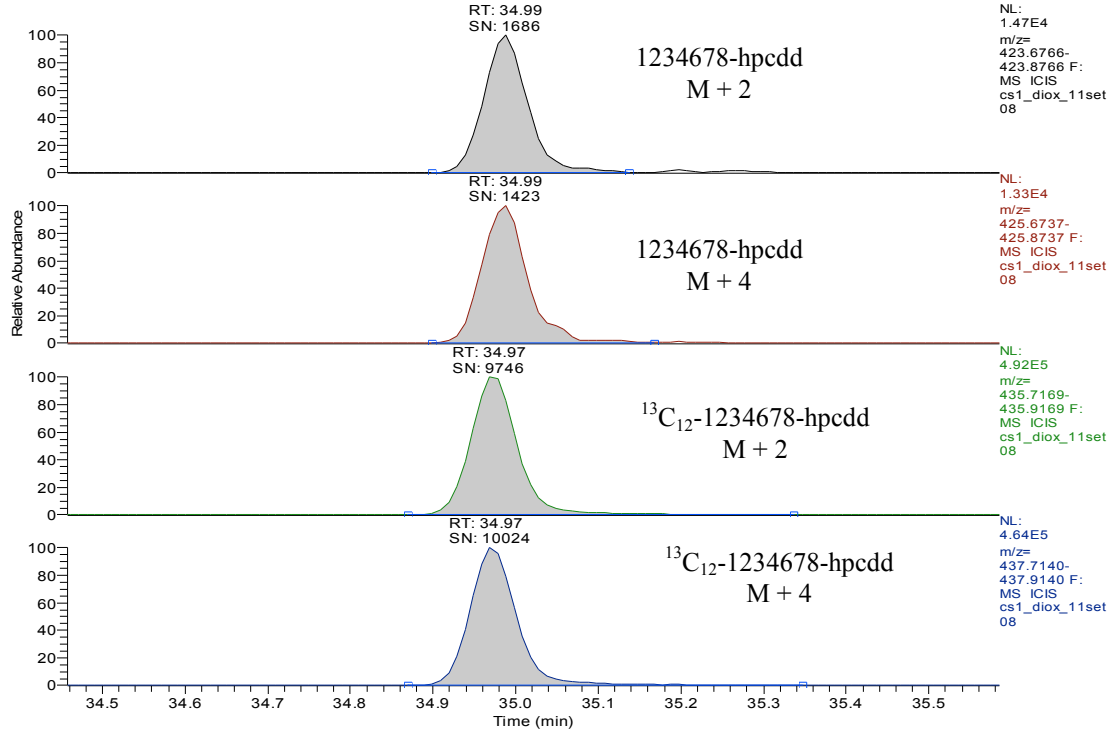
Figura 3.5: Esempi di cromatogrammi di DIOSSINE (da 4 a 8 Cloro-sostituzioni) e FURANI (da 4 a 8 Cloro-sostituzioni) in successione ottenuti con l'applicazione QualBrowser del software Xcalibur.



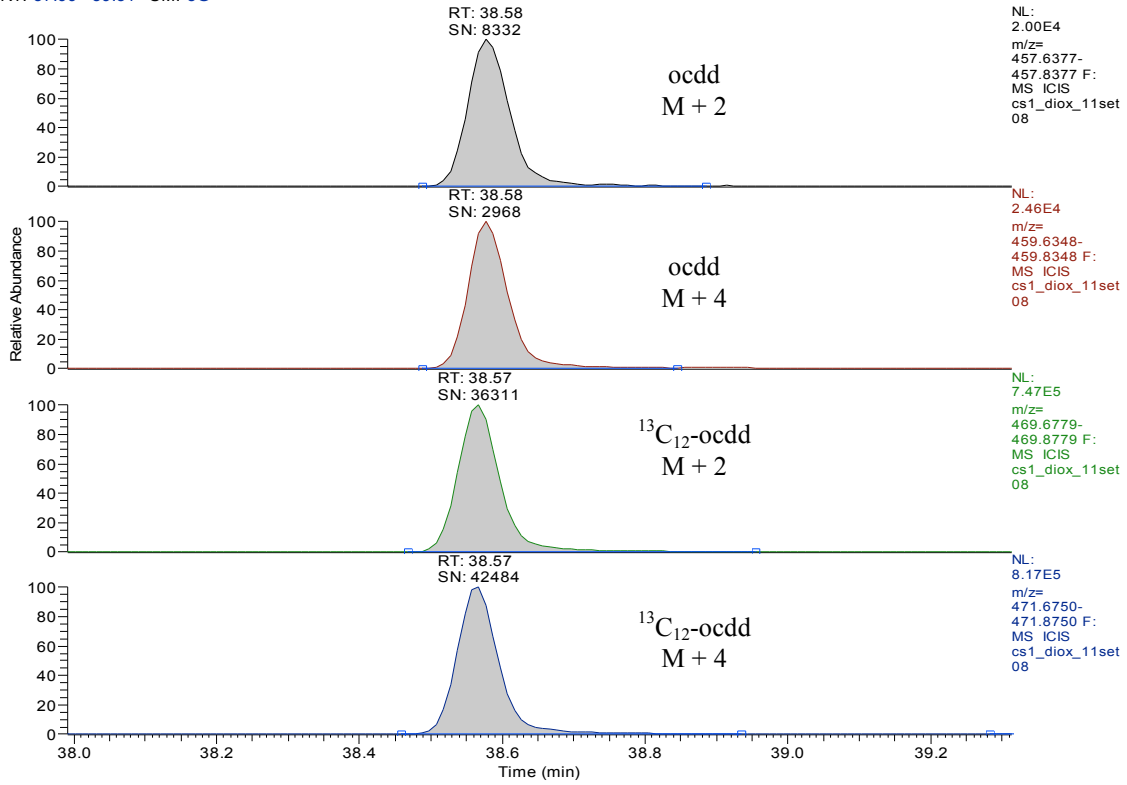
RT: 30.11 - 31.55 SM: 5G



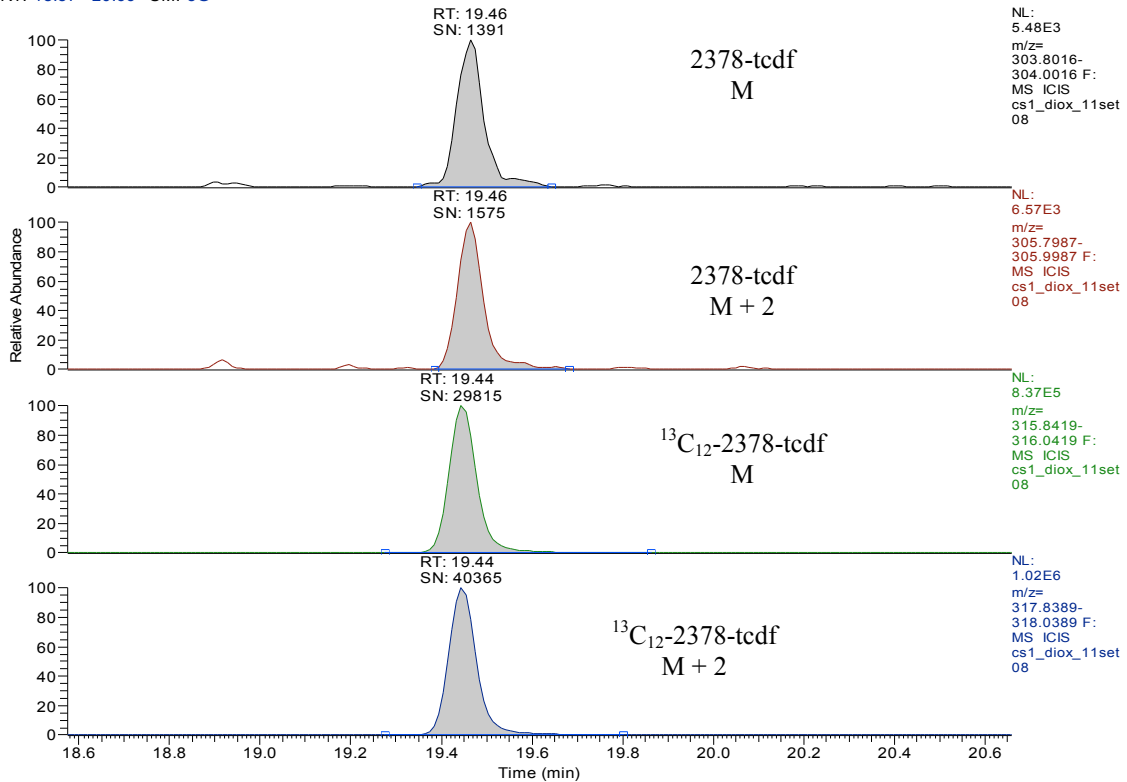
RT: 34.46 - 35.58 SM: 5G



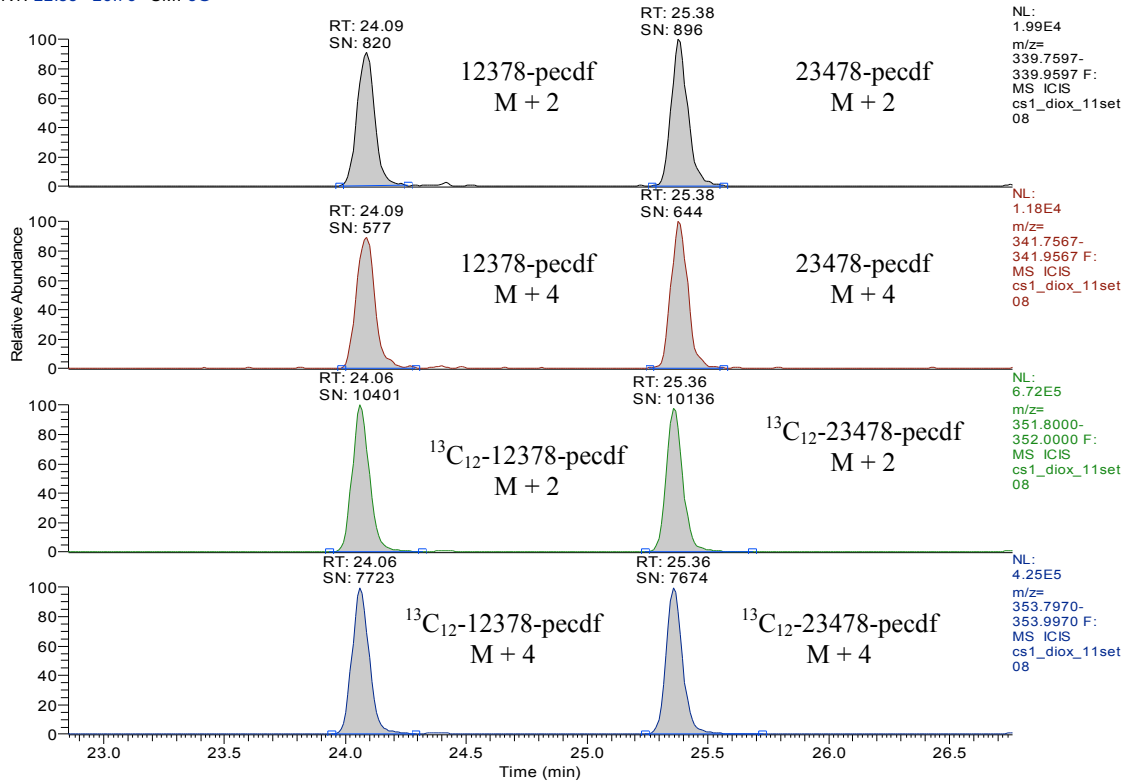
RT: 37.99 - 39.31 SM: 5G



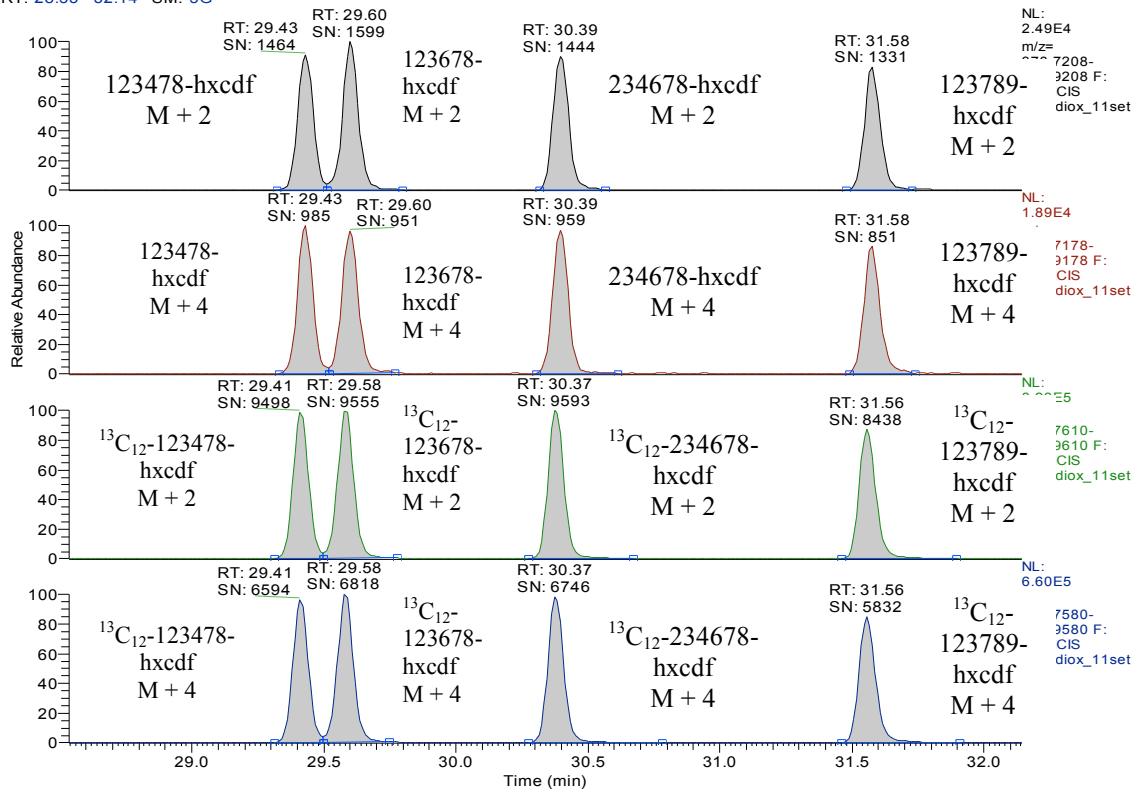
RT: 18.57 - 20.66 SM: 5G

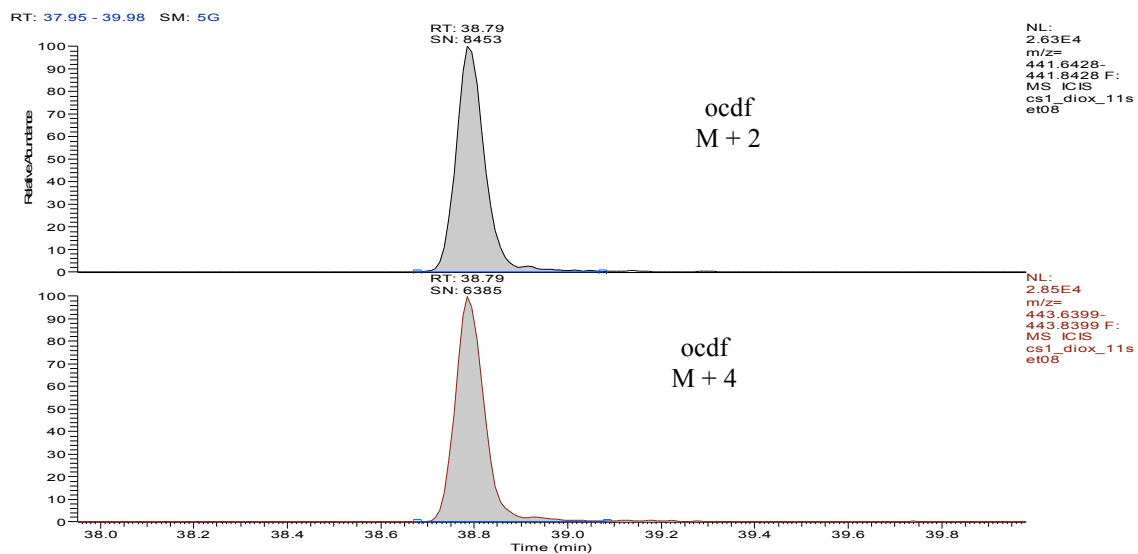
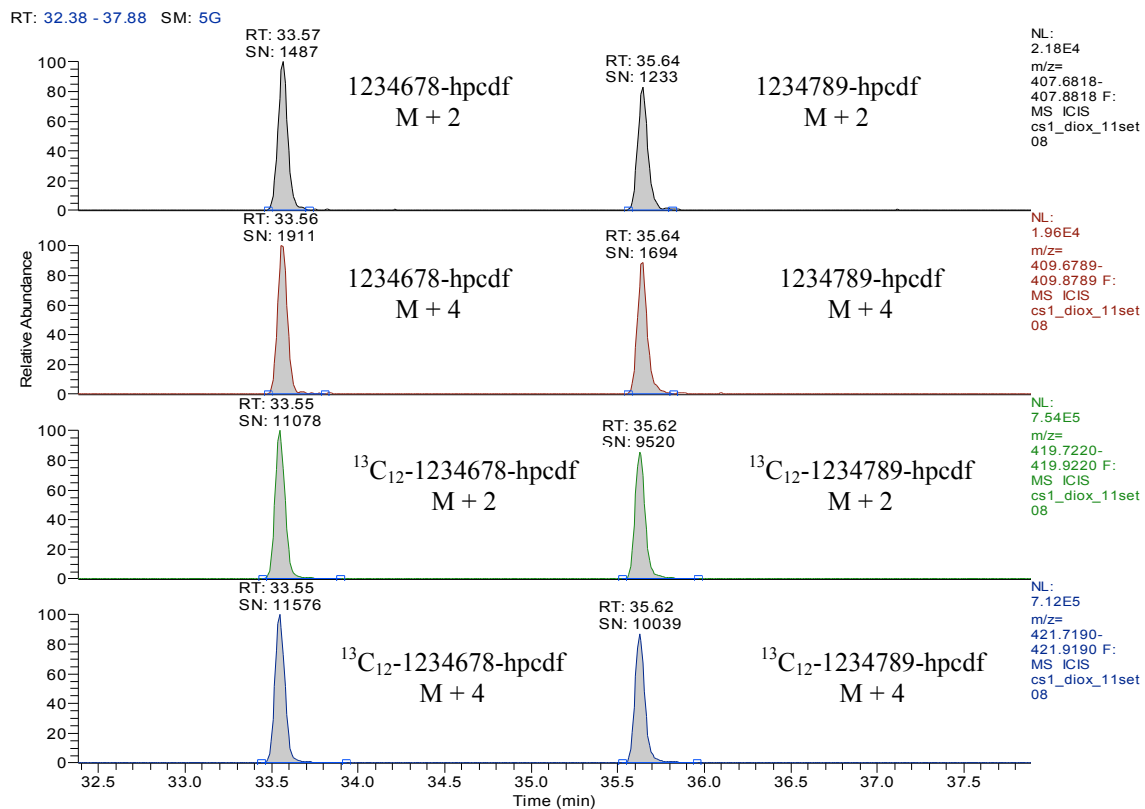


RT: 22.85 - 26.76 SM: 5G



RT: 28.53 - 32.14 SM: 5G





3.6. TARATURA

Prima di procedere con la taratura, è necessario ottimizzare le condizioni strumentali sia gascromatografiche che dello spettrometro di massa in modo da operare in buone condizioni di separazione dei composti e di sensibilità.

In particolare, è importante che la risoluzione dello spettrometro di massa sia almeno 10.000 perciò, prima della taratura è necessario verificare e controllare tutti i parametri di tune ed, al limite, fare gli opportuni aggiustamenti.

3.6.1. STANDARD DI TARATURA

Per la taratura vengono utilizzati cinque livelli della soluzione standard (CS = Calibration Standard) contenente i seguenti composti nativi e marcati di PCDD/PCDF e ai diversi livelli di concentrazione:

Componenti nativi	CS 0.1 Conc. (ng/mL)	CS 0.2 Conc. (ng/mL)	CS 1 Conc. (ng/mL)	CS 2 Conc. (ng/mL)	CS 3 Conc. (ng/mL)
2,3,7,8 Tetra-CDD	0.05	0.10	0.5	2.0	10.0
2,3,7,8 Tetra-CDF	0.05	0.10	0.5	2.0	10.0
1,2,3,7,8 Penta-CDD	0.25	0.50	2.5	10.0	50.0
1,2,3,7,8 Penta-CDF	0.25	0.50	2.5	10.0	50.0
2,3,4,7,8 Penta-CDF	0.25	0.50	2.5	10.0	50.0
1,2,3,4,7,8 Esa-CDD	0.25	0.50	2.5	10.0	50.0
1,2,3,6,7,8 Esa-CDD	0.25	0.50	2.5	10.0	50.0
1,2,3,7,8,9 Esa-CDD	0.25	0.50	2.5	10.0	50.0
1,2,3,4,7,8 Esa-CDF	0.25	0.50	2.5	10.0	50.0
1,2,3,6,7,8 Esa-CDF	0.25	0.50	2.5	10.0	50.0
1,2,3,7,8,9 Esa-CDF	0.25	0.50	2.5	10.0	50.0
2,3,4,6,7,8 Esa-CDF	0.25	0.50	2.5	10.0	50.0
1,2,3,4,6,7,8 Epta-CDD	0.25	0.50	2.5	10.0	50.0
1,2,3,4,6,7,8 Epta-CDF	0.25	0.50	2.5	10.0	50.0
1,2,3,4,7,8,9 Epta-CDF	0.25	0.50	2.5	10.0	50.0
Octa-CDD	0.50	1.00	5.0	20.0	100.0
Octa-CDF	0.50	1.00	5.0	20.0	100.0
Componenti marcati					
2,3,7,8 Tetra-CDD ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100
2,3,7,8 Tetra-CDF ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100
1,2,3,7,8 Penta-CDD ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100
1,2,3,7,8 Penta-CDF ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100
2,3,4,7,8 Penta-CDF ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100
1,2,3,4,7,8 Esa-CDD ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100
1,2,3,6,7,8 Esa-CDD ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100
1,2,3,4,7,8 Esa-CDF ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100
1,2,3,6,7,8 Esa-CDF ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100
1,2,3,7,8,9 Esa-CDF ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100

2,3,4,6,7,8 Esa-CDF ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100
1,2,3,4,6,7,8 Epta-CDD ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100
1,2,3,4,6,7,8 Epta-CDF ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100
1,2,3,4,7,8,9 Epta-CDF ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100
Octa-CDD ¹³ C ₁₂	200	200	200	200	200
<i>Internal Standards</i>					
1,2,3,4 Tetra-CDD ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100
1,2,3,7,8,9 Esa-CDD ¹³ C ₁₂	100	100	100	100	100

Tabella 3.5: Composizione e livelli di concentrazione degli standard di taratura (EDF-999-0.1, 0.2; EDF-999).

Queste soluzioni permettono di misurare la risposta relativa (marcati contro nativi) ed il fattore di risposta in funzione delle concentrazioni.

Il livello CS1 viene utilizzato per la verifica della taratura (vd. par. 3.6.5.).

3.6.2. TARATURA CON DILUIZIONE ISOTOPICA

La calibrazione in diluizione isotopica è usata per quantificare i 15 composti di diossine e furani 2,3,7,8-sostituiti per i quali vengono aggiunti i rispettivi composti marcati al campione prima dell'estrazione.

Il fattore di risposta relativo (*RR*) di ciascun CDD/CDF rispettivamente al suo analogo marcato è determinato usando l'area sottesa di entrambe i rapporti esatti m/z primari e secondari ed è così calcolato:

$$RR = \frac{(A1_n + A2_n) * C_l}{(A1_l + A2_l) * C_n} \quad (3.1)$$

dove

RR = fattore di risposta relativo (marcati su nativi)

l = marcato

n = nativo

A1_n e *A2_n* sono le aree del picco rispettivamente dello ione primario e dello ione secondario del relativo composto nativo

A1_l e *A2_l* sono le aree del picco rispettivamente dello ione primario e dello ione secondario del relativo composto marcato

C_l concentrazione teorica del composto marcato nello standard di taratura in ng/mL

C_n concentrazione teorica del composto nativo nello standard di taratura in ng/mL

Si otterranno tanti fattori di risposta *RR* quanti sono i livelli di taratura.

3.6.3. TARATURA CON STANDARD INTERNO

Il metodo dello standard interno viene utilizzato per la determinazione di 1,2,3,7,8,9-HxCDD e OCDF, i composti non-2,3,7,8-sostituiti, e per il calcolo dei recuperi dei composti marcati.

Si definisce il fattore di risposta (*RF*) come segue:

$$RF = \frac{(A1_s + A2_s) * C_{is}}{(A1_{is} + A2_{is}) * C_s} \quad (3.2)$$

dove

s = nativo

is = standard interno

A1_s e *A2_s* = aree del picco rispettivamente dello ione primario e dello ione secondario del relativo composto nativo

A1_{is} e *A2_{is}* = aree del picco rispettivamente dello ione primario e dello ione secondario del relativo composto dello standard di siringa

C_{is} = concentrazione dello standard interno di siringa in ng/mL

C_s = concentrazione del composto nativo nello standard di taratura in ng/mL

Il fattore di risposta verrà calcolato per ciascun livello di taratura.

3.6.4. TARATURA COMBINATA

Usando quindi le soluzioni di standard di taratura, in un unico set di analisi si possono costruire le curve di taratura per i metodi di quantificazione in diluizione isotopica e con standard interno.

3.6.5. VERIFICA DELLA TARATURA

Prima dell'analisi di ciascun set di campioni, la validità della taratura viene verificata per ciascun analita, iniettando un livello di standard, il CS1 (VER), corrispondente ad un livello intermedio della taratura.

La verifica è superata se:

- il rapporto isotopico è rispettato (tabella 3.4);
- i picchi rappresentanti ciascun composto nativo e marcato sono presenti con S/N ≥ 10;
- le concentrazioni ottenute rientrano negli intervalli richiesti. I limiti sono quelli riportati nella tab.6 del metodo EPA 1613B/94 ricalcolati in base al livello di concentrazione adottato (tabella 3.6).

PCDD/F	CS 1 (ng/mL)	Inf	Sup
2378-TeCDF	0.5	0.42	0.60
12378-PeCDF	2.5	2.05	3.00
23478-PeCDF	2.5	2.05	3.05
123478-HxCDF	2.5	2.25	2.80
123678-HxCDF	2.5	2.20	2.85
234678-HxCDF	2.5	2.20	2.85
123789-HxCDF	2.5	2.25	2.80
1234678-HpCDF	2.5	2.25	2.75
1234789-HpCDF	2.5	2.15	2.90
OCDF	5.0	3.15	7.95

2378-TeCDD	0.5	0.39	0.65
12378-PeCDD	2.5	1.95	3.25
123478-HxCDD	2.5	1.95	3.20
123678-HxCDD	2.5	1.95	3.20
123789-HxCDD	2.5	2.05	3.05
1234678-HpCDD	2.5	2.15	2.90
OCDD	5.0	3.95	6.30

Tabella 3.6: criteri di accettabilità per la verifica della taratura.

Se tutti i composti rispondono a tali requisiti, si può procedere con l'analisi dei campioni estratti, altrimenti, se anche solo un composto non incontra questi requisiti di accettabilità, è necessario ripetere la taratura o, individuata la causa del problema, correggere la causa e ripetere il controllo della risoluzione ed il test di verifica della taratura.

Questa corsa cromatografica è utile anche per verificare l'efficienza della colonna controllando che la separazione del 1,2,3,4,7,8 Esa-CDF dal 1,2,3,6,7,8 Esa-CDF sia $\leq 50\%$.

Se tale condizione non è soddisfatta, è necessario provvedere con un opportuno intervento di manutenzione (per es. taglio in testa di un pezzo di colonna).

3.7. QUANTIFICAZIONE

I congeneri si quantificano utilizzando la tecnica della diluizione isotopica (15 congeneri 2,3,7,8-clorosostituiti) o dello standard interno (per 1,2,3,7,8,9-HxCDD e OCDF) utilizzando i fattori di risposta medi ottenuti attraverso la taratura.

3.7.1. QUANTIFICAZIONE PER DILUIZIONE ISOTOPICA

Aggiungendo una quantità nota di composti marcati a ciascun campione prima dell'estrazione, è possibile operare una correzione dei recuperi delle PCDD/PCDF perché le diossine ed i loro marcati mostrano gli stessi effetti durante l'estrazione, concentrazione ed analisi gascromatografica.

La concentrazione di diossine e furani nativi nell'estratto finale pertanto sarà uguale a:

$$C_{ex} (pg / mL) = \frac{(A1_n + A2_n) * C_l}{(A1_l + A2_l) * RR} \quad (3.3)$$

dove

RR = fattore di risposta relativo medio (marcati su nativi)

l = marcato

n = nativo

$A1_n$ e $A2_n$ sono le aree del picco rispettivamente dello ione primario e dello ione secondario del relativo composto nativo eventualmente presente
 $A1_l$ e $A2_l$ sono le aree del picco rispettivamente dello ione primario e dello ione secondario del relativo composto marcato
 C_l = concentrazione teorica del composto marcato nello standard di calibrazione in pg/mL

A causa di una potenziale interferenza, l'analogo marcato del OCDF non è aggiunto al campione, perciò l'OCDF viene quantificato con la OCDD. La concentrazione dell'OCDF viene corretta per il recupero della OCDD marcata. Nei casi in cui l'OCDD e l'OCDF si comportino in maniera diversa durante le fasi di lavorazione del campione, questo potrebbe diminuire l'accuratezza dei risultati per l'OCDF. Comunque, vista la bassa tossicità di questo composto rispetto alle altre diossine e furani, questa diminuzione di accuratezza non è considerata significativa.

Inoltre, poiché l'esa-diossina marcata così sostituita, $^{13}C_{12}$ 1,2,3,7,8,9-HxCDD, viene usata come standard interno di siringa al momento dell'iniezione strumentale, essa non può essere utilizzata per quantificare strettamente in diluizione isotopica la corrispondente esa-diossina nativa. In ogni caso, l'1,2,3,7,8,9-HxCDD viene quantificata usando il fattore di risposta medio degli analoghi marcati delle altre due esa-diossine 2,3,7,8-sostituite: 1,2,3,4,7,8-HxCDD e 1,2,3,6,7,8-HxCDD.

La concentrazione della 1,2,3,7,8,9-HxCDD è corretta per il recupero medio delle due HxCDD.

3.7.2. QUANTIFICAZIONE CON STANDARD INTERNO

Le concentrazioni di 123789-HxCDD e di OCDF nell'estratto finale saranno uguali a:

$$C_{ex^{13}C} (pg / mL) = \frac{(A1_s + A2_s) * C_{is}}{(A1_{is} + A2_{is}) * RF} \quad (3.4)$$

dove

RF = fattore di risposta medio

s = nativo

is = standard interno

$A1_s$ e $A2_s$ = aree del picco rispettivamente dello ione primario e dello ione secondario del relativo composto nativo eventualmente presente

$A1_{is}$ e $A2_{is}$ = aree del picco rispettivamente dello ione primario e dello ione secondario del relativo composto dello standard di siringa

C_{is} = concentrazione teorica dello standard interno di siringa in pg/mL

3.7.3. RECUPERI DEI COMPOSTI MARCATI

Il recupero percentuale dei composti marcati sarà calcolato con la seguente formula:

$$recupero\% = \frac{C_{ex^{13}C} \text{ calcolata}}{C_{ex^{13}C} \text{ aggiunti}} * 100 \quad (3.5)$$

dove

$C_{ex}^{13}c$ aggiunti = concentrazione dello standard marcato con cui è stato inizialmente drogato il campione in pg/mL

Il recupero di ciascun composto marcato deve essere compreso all'interno dei limiti riportati in Tab.7 del metodo EPA 1613B/94 che qui sotto viene riportata:

Composto	Recupero %
2,3,7,8 Tetra-CDD $^{13}C_{12}$	25 – 164
2,3,7,8 Tetra-CDF $^{13}C_{12}$	24 – 169
1,2,3,7,8 Penta-CDD $^{13}C_{12}$	25 – 181
1,2,3,7,8 Penta-CDF $^{13}C_{12}$	24 – 185
2,3,4,7,8 Penta-CDF $^{13}C_{12}$	21 – 178
1,2,3,4,7,8 Esa-CDD $^{13}C_{12}$	32 – 141
1,2,3,6,7,8 Esa-CDD $^{13}C_{12}$	28 – 130
1,2,3,4,7,8 Esa-CDF $^{13}C_{12}$	26 – 152
1,2,3,6,7,8 Esa-CDF $^{13}C_{12}$	26 – 123
1,2,3,7,8,9 Esa-CDF $^{13}C_{12}$	29 – 147
2,3,4,6,7,8 Esa-CDF $^{13}C_{12}$	28 – 136
1,2,3,4,6,7,8 Epta-CDD $^{13}C_{12}$	23 – 140
1,2,3,4,6,7,8 Epta-CDF $^{13}C_{12}$	28 – 143
1,2,3,4,7,8,9 Epta-CDF $^{13}C_{12}$	26 – 138
Octa-CDD $^{13}C_{12}$	17 – 157

Tabella 3.7: intervalli di accettabilità dei recuperi % dei composti marcati di processo

3.7.4. CALCOLO DELLA CONCENTRAZIONE FINALE

La concentrazione nell'estratto rapportata al volume di acqua estratto (V in L) darà la concentrazione finale:

$$C(\text{pg} / \text{L}) = \frac{C_{ex}}{V} \quad (3.6)$$

4. VALIDAZIONE DEL METODO

Attraverso il processo di validazione, si intende nel presente capitolo dimostrare con evidenze oggettive che i risultati delle prove eseguite sperimentalmente in laboratorio siano adatte all'utilizzo previsto e corrispondano alle esigenze del cliente e/o richieste dalla normativa.

Una volta fissati i requisiti dei parametri di validazione, sono stati ricavati sperimentalmente i valori dei parametri di validazione, ne è stata giudicata l'accettabilità e dopodiché è stato stabilito come verificare nel tempo la validazione.

Lo scopo della procedura, determinazione di diossine e furani, è di condurre un'analisi quantitativa su microtracce quindi i parametri di validazione solitamente richiesti per tale scopo sono i seguenti:

- Selettività
- Linearità-Taratura
- Limite di rivelabilità (LOD)
- Limite di quantificazione (LOQ)
- Ripetibilità stretta
- Campo di applicazione (che generalmente coincide col campo di linearità)
- Incertezza di misura

4.1. DEFINIZIONI

CAMPO DI APPLICAZIONE

Intervallo di valori del misurando entro il quale i parametri di validazione hanno valori accettabili.

ESATTEZZA

Grado di concordanza fra il valore medio ottenuto da un grande insieme di risultati di prova e un valore di riferimento accettato.

Nota: la misura dell'esattezza è di solito espressa in termini di spostamento (bias). Traduce il termine Trueness.

INCERTEZZA

Parametro, associato al risultato di misurazione, che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuiti al misurando.

LIMITE DI QUANTIFICAZIONE (LOQ)

Livello minimo al quale un analita può essere determinato quantitativamente con una precisione ed esattezza accettabili.

LIMITE DI RIPETIBILITÀ

Il valore al di sotto (o in corrispondenza) del quale dovrebbe cadere, con la probabilità del 95%, la differenza assoluta tra due risultati di prova ottenuti in condizioni di ripetibilità. Il simbolo utilizzato è r .

LIMITE DI RIVELABILITÀ (LOD)

Valore minimo al quale un analita può essere individuato ma non necessariamente quantificato come valore esatto.

Nota: traduce il termine Limit of Detection.

LINEARITÀ

Proprietà di un metodo di produrre risultati direttamente proporzionali alla concentrazione dell'analita nel campione.

METHOD DETECTION LIMIT (MDL)

MDL è la concentrazione minima di una sostanza che può essere misurata; tale concentrazione risulta maggiore di zero col 99% di confidenza. L'MDL è determinato sperimentalmente dall'analisi di un campione in una data matrice contenente l'analita.

PRECISIONE

Grado di concordanza fra risultati di prova indipendenti ottenuti nelle condizioni stabilite.

RIPETIBILITÀ

Precisione nelle condizioni di ripetibilità ossia nelle condizioni nelle quali risultati di prova indipendenti vengono ottenuti con lo stesso metodo, su un identico materiale, nello stesso laboratorio, dallo stesso operatore, usando la stessa apparecchiatura ed entro tempi brevi.

Nota: la ripetibilità in tali condizioni viene intesa in questa procedura come ripetibilità stretta. La precisione che si ottiene quando alcune di tali condizioni non sono mantenute costanti entro lo stesso laboratorio, viene intesa come ripetibilità intermedia (intermediate precision).

SELETTIVITÀ

Capacità di determinare inequivocabilmente l'analita di interesse, in presenza di composti (impurezze, prodotti di degradazione) che presumibilmente potrebbero essere presenti nei campioni da esaminare.

4.2. PARAMETRI DI VALIDAZIONE

4.2.1. SELETTIVITÀ

La selettività è la proprietà di un metodo di prova grazie alla quale l'analita di interesse viene determinato inequivocabilmente e ciò viene dimostrato:

- mediante l'utilizzo di HRMS;
- diluizione isotopica;
- silanizzazione vetreria;
- purificazione sia manuale sia automatica.

La procedura è selettiva in quanto prevede l'utilizzo di tecniche analitiche avanzate come la spettrometria di massa ad alta risoluzione, strumentazione adatta alle rivelazione e quantificazione di analiti presenti in microtracce.

Il metodo della diluizione isotopica rende inequivocabile ed univoca l'identificazione degli analiti d'interesse (vd. par. 3.5.1. Requisiti per l'Identificazione).

L'estrema accuratezza nel lavaggio della vetreria (trattamento di silanizzazione) e la purificazione sia manuale sia automatica rendono l'estratto finale del campione al massimo privo di interferenti o impurezze.

4.2.2. LINEARITÀ – TARATURA

È necessario individuare un intervallo di valori in cui esista una correlazione tra risposta strumentale e valore del misurando. È conveniente, anche se non strettamente necessario, che tale correlazione sia lineare. Trovare una correlazione è indispensabile per tarare lo strumento di misura relativamente alla grandezza in esame (che di solito è la concentrazione).

4.2.2.1. VERIFICA DELLA LINEARITÀ

Gli standard disponibili sono miscele di congeneri di PCDD/F sia nativi sia marcati a diversi livelli di concentrazione. I livelli di concentrazione sono 7 dal CS 0.1 al CS3 (vd. Tabella 3.5) ed inoltre CS4 (conc. nativi in ng/mL: tetra 40, penta-esa-epta 200, octa 400) e CS5 (conc. nativi in ng/mL: tetra 200, penta-esa-epta 1000, octa 2000) che hanno la stessa concentrazione di congeneri marcati dei precedenti.

In prima approssimazione, si ipotizza una correlazione lineare applicando ai punti sperimentali il metodo dei minimi quadrati.

In tal modo si identificano una retta di regressione e la sua equazione ponendo sull'asse delle ascisse i valori delle concentrazioni degli standard (conc. teor. in ng/mL) e sull'asse delle ordinate il rapporto delle aree-nativi su marcati (vd. par. 3.7. Taratura).

Dopo aver calcolato la retta di regressione lineare, si valutano i parametri di qualità della retta: scarto tipo dei residui (SD residuals), scarto tipo della pendenza (standard error-slope) e della intercetta (standard error-intercept), coefficiente di correlazione (R^2).

L'accettabilità dell'ipotesi di linearità viene verificata in base ai seguenti criteri:

- $R^2 > 0,990$ (requisito necessario ma non sufficiente);
- l'intercetta statisticamente uguale a zero, cioè l'intervallo di confidenza al 95% dell'intercetta deve comprendere il valore zero;
- la distribuzione dei residui intorno allo zero deve essere casuale (è sufficiente una valutazione visiva).

In seguito, si riportano solo a titolo esemplificativo, lo studio di linearità di alcuni congeneri: 12378-PeCDF e 123678-HxCDD .

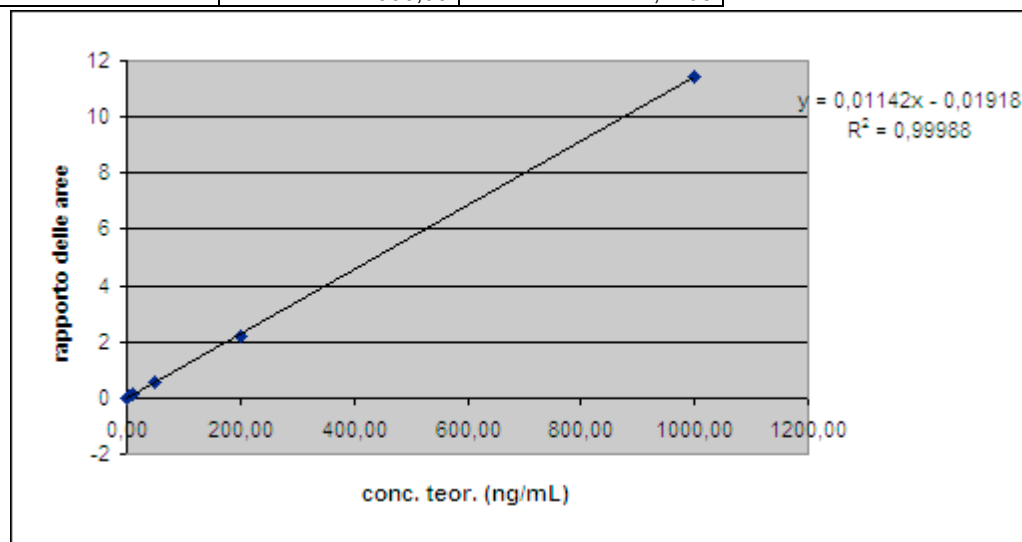
Linearità - Taratura

12378 PeCDF

data acquisizione:

09/09/2008

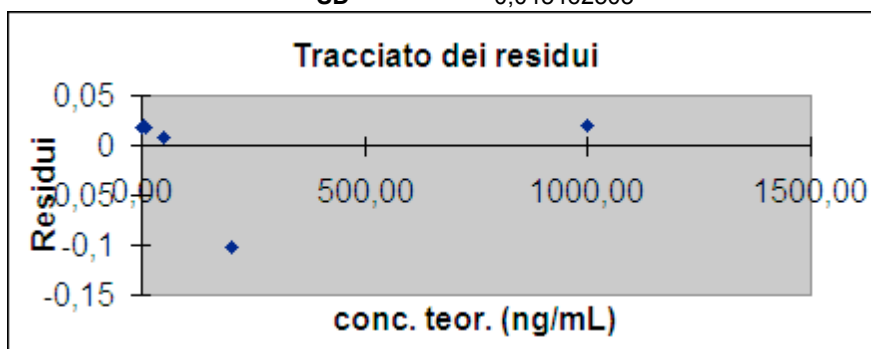
	conc. teor. (ng/mL)	Rapporto delle Aree
CS 0.1	0,25	0,0026
CS 0.2	0,50	0,0053
CS 1	2,50	0,0289
CS 2	10,00	0,1129
CS 3	50,00	0,5592
CS 4	200,00	2,1614
CS 5	1000,00	11,4168



	Coefficients	Standard Error	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	-0,019179177	0,021294803	-0,07391921	0,035560856
Slope	0,011416073	5,51776E-05	0,011274235	0,011557911

Observation	Predicted Y	Residuals
1	-0,016325159	0,018925159
2	-0,01347114	0,01877114
3	0,009361006	0,019538994
4	0,094981553	0,017918447
5	0,551624474	0,007575526
6	2,264035426	-0,102635426
7	11,39689384	0,01990616

SD = 0,045462503



Verifica dell'accettabilità dell'ipotesi di linearità:	requisiti soddisfatti?
a) $R^2 > 0.990$	SI
b) intercetta statisticamente uguale a zero	SI
c) residui normalmente distribuiti	SI

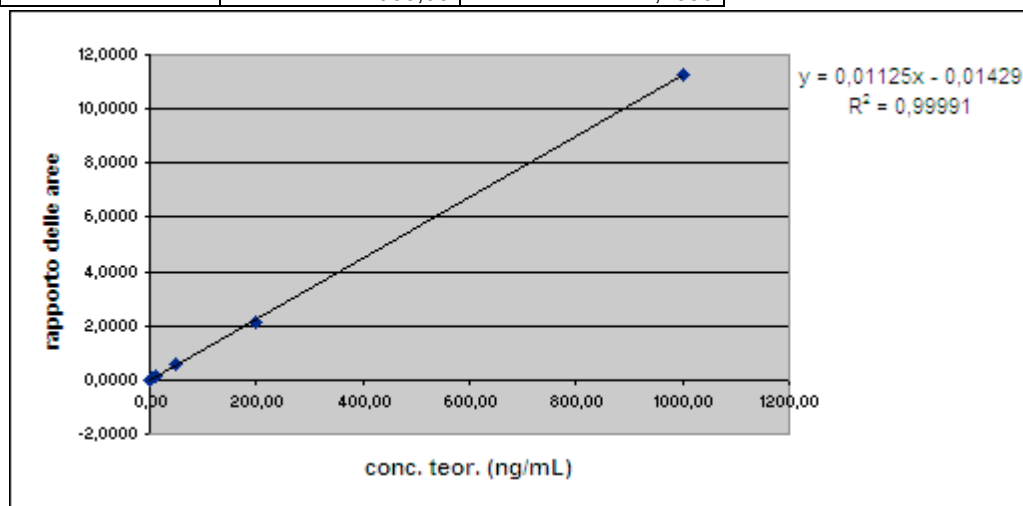
Linearità - Taratura

123678 HxCDD

data acquisizione:

09/09/2008

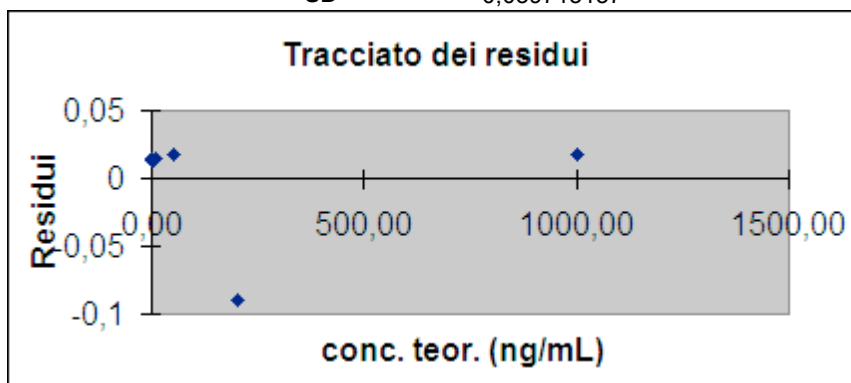
	conc. teor. (ng/mL)	Rapporto delle Aree
CS 0.1	0,25	0,0029
CS 0.2	0,50	0,0053
CS 1	2,50	0,0270
CS 2	10,00	0,1122
CS 3	50,00	0,5658
CS 4	200,00	2,1458
CS 5	1000,00	11,2530



	Coefficients	Standard Error	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	-0,014286687	0,018601779	-0,062104081	0,033530708
Slope	0,011250352	4,81996E-05	0,011126451	0,011374253

Observation	Predicted Y	Residuals
1	-0,011474099	0,014374099
2	-0,008661511	0,013961511
3	0,013839192	0,013160808
4	0,09821683	0,01398317
5	0,548230899	0,017569101
6	2,235783657	-0,089983657
7	11,23606503	0,016934968

SD = 0,039713137



Verifica dell'accettabilità dell'ipotesi di linearità:	requisiti soddisfatti?
a) $R^2 > 0.990$	SI
b) intercetta statisticamente uguale a zero	SI
c) residui normalmente distribuiti	SI

4.2.2.2. MODALITÀ DI TARATURA

Una volta dimostrata la linearità attraverso una taratura su 7 punti, si può adottare una strategia di taratura più semplificata per il lavoro routinario, perciò, considerando i limiti di legge richiesti molto bassi ed i valori altrettanto bassi rilevati nelle acque superficiali del bacino scolante, si è deciso di effettuare una taratura su 5 punti: dal CS 0.1 al CS 3.

Siccome la strumentazione è stabile nel lungo periodo, si controlla nel tempo la validità della regressione. Il controllo si esegue iniettando il livello CS 1, detto VER. (vd. par. 3.7.5. Verifica della Taratura).

4.2.3. LIMITE DI RILEVABILITÀ - MDL

Il limite di rilevabilità è stato determinato col metodo EPA (40 CFR 136, App. B, rev. 1.11.).

Nel metodo, l'LOD è definito come il più basso livello di concentrazione determinabile statisticamente diverso da un bianco col 99% di confidenza. LOD è specifico della matrice, del metodo e dell'analita.

Per la certificazione del laboratorio, l'LOD è approssimativamente uguale al MDL per quelle prove nelle quali l'MDL può essere calcolato.

4.2.3.1. SCOPO

Si vorrebbe dimostrare che la concentrazione minima rilevabile dallo strumento corrisponde al livello inferiore della curva di taratura, cioè 0.05 ng/mL per le tetra, 0.25 ng/mL per penta-esa-epta, 0.50 ng/mL per octa diossine/furani.

4.2.3.2. BIANCO

La stessa procedura descritta nel Cap. 3, uguale per quantità e qualità dei materiali, è stata effettuata per l'analisi di un bianco procedurale (2 L di acqua distillata drogati solo con 1 mL di standard di estrazione a 0.5-1 ng ass). Le aree degli eventuali nativi osservati nella determinazione strumentale devono essere detratte dalle aree osservate per il campione.

L'analisi del bianco è risultata priva di nativi.

4.2.3.3. PROCEDIMENTO PER LA DETERMINAZIONE DELL'MDL

Per determinare l'MDL, sono state condotte 8 prove ripetute su una matrice fortificata (spike) con la stessa procedura descritta nel Cap. 3.

Lo spike è costituito da 2L d'acqua distillata drogata con 1 mL di soluzione di standard nativi (precedentemente preparata alla concentrazione corrispondente al limite inferiore della curva di taratura, cioè di 0.5 pg ass per tetra, 2.5 pg ass per penta-esa-epta, 5.0 pg ass per octa-diossine/furani) e con 1 mL di standard marcati di estrazione a 0.5-1 ng ass.

Dopo aver ottenuto i risultati, per ciascun congenere è stata calcolata la varianza (S^2) delle misure ripetute con la formula statistica classica e la deviazione standard (S) come segue:

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \left[\sum_{i=1}^n X_i^2 - \left(\frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \right)^2 \right] \quad (4.1)$$

$$S = (S^2)^{\frac{1}{2}} \quad (4.2)$$

dove

X_i sono i risultati analitici ottenuti dalle n misure condotte; Σ sta per la somma degli X valori da $i=1$ a n (=8 in questo caso).

L'MDL si calcola con la formula seguente:

$$\text{MDL} = t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} (S) \quad (4.3)$$

dove

$t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)}$ = il valore della t di Student appropriato per un livello di confidenza del 99 % ed una deviazione standard stimata con $n-1$ gradi di libertà. Per $n = 8$ misure ripetute, quindi per $n-1 = 7$ gradi di libertà, il valore di Student tabulato al livello di confidenza del 99% è di 2.998.

4.2.3.4.DETERMINAZIONE STATISTICA DEGLI OUTLIERS

È possibile che in una serie di n misure uno o più risultati siano molto più alti o molto più bassi dal resto dei dati.

Per valutare se il risultato sia aberrante (outlier), e vada quindi scartato, o debba essere incluso nel calcolo della media, si può eseguire il test di Grubbs.

Si definisce un livello di significatività α (del 5% o dell'1%).

Si calcola la grandezza T :

$$T = \frac{|\bar{X} - X^*|}{S} \quad (4.4)$$

dove

X^* è il valore sospetto;

\bar{X} è la media di tutti i valori n ;

S è la deviazione standard calcolata considerando tutti i valori.

Si confronta il valore di T calcolato con il valore tabulato (per n dati e per $1-\alpha$).

Se T calcolato risulta superiore a T tabulato, allora si può affermare (con una certa probabilità determinata da α) che X^* è un dato anomalo e deve essere eliminato.

4.2.3.5. REQUISITI DI ACCETTABILITÀ DELL'MDL

I requisiti minimi perché l'MDL calcolato sia accettabile sono:

1. che il livello di spike sia superiore all'MDL calcolato;
2. che il livello di spike sia inferiore a 10 volte l'MDL calcolato;
3. che i recuperi delle repliche siano ragionevoli (vd. Tabella 3.7).

I valori ottenuti sono riportati nelle pagine seguenti. Per semplicità, si riportano solo alcuni risultati relativi ai congeneri: 2378-TCDD, 2378-TCDF, 1234678-HpCDD e OCDF.

MDL 2378 TCDD

data

acquisizione:

22/10/2008

	conc. sper. (pg/L)	rec %	conc. teor. (pg/L)	T calc	T tab (0,99) per n=8		CV %	limite di ripetibilità r
spike_1	0,28	112	0,25	0,68	<2.22	no outlier	17,8	0,19
spike_2	0,16	64		2,03	<2.22	no outlier		
spike_3	0,23	92		0,45	<2.22	no outlier		
spike_4	0,30	120		1,13	<2.22	no outlier		
spike_5	0,29	116		0,90	<2.22	no outlier		
spike_6	0,24	96		0,23	<2.22	no outlier		
spike_7	0,24	96		0,23	<2.22	no outlier		
spike_8	0,26	104		0,23	<2.22	no outlier		

conc. media (pg/L)	0,25	100
dev. std. S	0,044	

MDL (pg/L)	0,13
------------	------

10 x MDL (pg/L)	1,33
--------------------	------

Verifica dell'accettabilità dell'MDL:	requisiti soddisfatti?
1. MDL < conc. teor. (pg/L)	SI
2. conc. Teor. < 10 x MDL (pg/L)	SI
3. recuperi ragionevoli?	SI

MDL**2378 TCDF**data
acquisizione:

22/10/2008

	conc. sper. (pg/L)	rec %	conc. teor. (pg/L)	T calc	T tab (0,99) per n=8		CV %	limite di ripetibilità r
spike_1	0,41	164	0,25	1,87	<2.22	no outlier	19,6	0,25
spike_2	0,25	100		0,85	<2.22	no outlier		
spike_3	0,24	96		1,02	<2.22	no outlier		
spike_4	0,33	132		0,51	<2.22	no outlier		
spike_5	0,27	108		0,51	<2.22	no outlier		
spike_6	0,29	116		0,17	<2.22	no outlier		
spike_7	0,26	104		0,68	<2.22	no outlier		
spike_8	0,35	140		0,85	<2.22	no outlier		

conc. media (pg/L)	0,30	120
dev. std. S	0,059	

MDL (pg/L)	0,18
------------	------

10 x MDL (pg/L)	1,76
-----------------	------

Verifica dell'accettabilità dell'MDL:	requisiti soddisfatti?
1. MDL < conc. teor. (pg/L)	SI
2. conc. Teor. < 10 x MDL (pg/L)	SI
3. recuperi ragionevoli?	SI

MDL

data acquisizione:

1234678 HpCDD

22/10/2008

	conc. sper. (pg/L)	rec %	conc. teor. (pg/L)	T calc	T tab (0,99) per n=8		CV %	limite di ripetibilità r
spike_1	1,45	116	1,25	1,61	<2.22	no outlier	5,9	0,33
spike_2	1,23	98		1,19	<2.22	no outlier		
spike_3	1,36	109		0,46	<2.22	no outlier		
spike_4	1,29	103		0,43	<2.22	no outlier		
spike_5	1,34	107		0,21	<2.22	no outlier		
spike_6	1,23	98		1,19	<2.22	no outlier		
spike_7	1,40	112		0,97	<2.22	no outlier		
spike_8	1,29	103		0,43	<2.22	no outlier		

conc. media (pg/L)	1,32	106
dev. std. S	0,079	

MDL (pg/L)	0,24
------------	------

10 x MDL (pg/L)	2,35
-----------------	------

Verifica dell'accettabilità dell'MDL:	requisiti soddisfatti?
1. MDL < conc. teor. (pg/L)	SI
2. conc. Teor. < 10 x MDL (pg/L)	SI
3. recuperi ragionevoli?	SI

MDL

data
acquisizione:

OCDF

22/10/2008

	conc. sper. (pg/L)	rec %	conc. teor. (pg/L)	T calc	T tab (0,99) per n=8		CV %	limite di ripetibilità r
spike_1	2,76	110	2,50	0,16	<2.22	no outlier	4,1	0,48
spike_2	2,72	109		0,51	<2.22	no outlier		
spike_3	2,92	117		1,26	<2.22	no outlier		
spike_4	2,83	113		0,47	<2.22	no outlier		
spike_5	2,76	110		0,16	<2.22	no outlier		
spike_6	2,63	105		1,31	<2.22	no outlier		
spike_7	2,66	106		1,04	<2.22	no outlier		
spike_8	2,94	118		1,44	<2.22	no outlier		

conc. media (pg/L)	2,78	111
Dev. std. S	0,113	

MDL (pg/L)	0,34
------------	------

10 x MDL (pg/L)	3,38
-----------------	------

Verifica dell'accettabilità dell'MDL:	requisiti soddisfatti?
1. MDL < conc. teor. (pg/L)	SI
2. conc. Teor. < 10 x MDL (pg/L)	SI
3. recuperi ragionevoli?	SI

Si può notare che i requisiti minimi sono soddisfatti per ciascun congenere e perciò si può affermare la validità degli MDL calcolati che risultano abbondantemente inferiori al livello di spike.

4.2.4. LIMITE DI QUANTIFICAZIONE (LOQ)

Il limite di quantificazione viene ricercato sperimentalmente. Dopo aver fissato una ripetibilità massima accettabile del 25%, sono state condotte 8 prove di ripetibilità su matrici fortificate, le stesse utilizzate per determinare l'MDL.

Il limite di quantificazione coincide, se non espressamente dichiarato, con il limite inferiore del campo di taratura, in questo caso è il CS 0.1, quindi possiamo dire che:

- LOQ Tetra-CDD/F = 0.05 ng/mL;
- LOQ Penta-Esa-Epta-CDD/F = 0.25 ng/mL;
- LOQ Octa-CDD/F = 0.50 ng/mL.

4.2.5. RIPETIBILITÀ STRETTA

La ripetibilità stretta (espressa come scarto tipo) consente di confrontare le prestazioni di laboratorio con quelle del metodo di riferimento o con quelle definite dal laboratorio stesso come adatte a soddisfare le esigenze del cliente e perché è decisivo nella stima della esattezza del metodo.

4.2.5.1. VALUTAZIONE DELLA RIPETIBILITÀ

La ripetibilità è stata determinata fortificando una matrice ed eseguendo n prove replicate indipendenti (le stesse condotte per determinare l'MDL). Lo scarto tipo o deviazione standard S si calcola con la formula statistica già vista in precedenza (eq. 4.1-4.2) previa eliminazione dei dati aberranti con il test di Grubbs.

La ripetibilità può essere espressa come scarto tipo relativo (coefficiente di variazione percentuale CV%, Relative Standard Deviation RSD) che ha il vantaggio di essere largamente costante al variare del livello di analita.

$$CV\% = \frac{S}{conc.media(pg/L)} \times 100 \quad (4.5)$$

La ripetibilità massima accettabile è del 25%.

4.2.5.2. LIMITE DI RIPETIBILITÀ

Il limite di ripetibilità è dato dalla seguente relazione:

$$r = t\sqrt{2} * S \quad (4.6)$$

dove t è la variabile di Student per $(n-1)$ gradi di libertà .

Tale parametro rappresenta la differenza massima ammissibile tra due misure successive e può essere utilizzato per verificare se il sistema analitico opera in condizioni controllate di ripetibilità eseguendo misure in doppio su campioni reali e verificando che la differenza sia $< r$.

4.2.6. CAMPO DI APPLICAZIONE

È l'intervallo dei valori del misurando, compresi gli estremi, entro cui la quantità dei parametri di validazione è ritenuta accettabile per l'uso previsto.

Se non espressamente dichiarato, il campo di applicazione coincide con l'intervallo di linearità ed il limite inferiore di tale intervallo coincide con il limite di quantificazione LOQ.

Si può dire che il campo di applicazione coincide con la taratura, quindi per la tetra va da 0.05 a 10.0 ng/mL, per le penta-esa-epta da 0.25 a 50.0 ng/mL ed infine per le octa da 0.5 a 100.0 ng/mL.

4.2.7. INCERTEZZA DI MISURA

La valutazione dell'incertezza di misura viene effettuata in conformità alle norme internazionali in vigore.

Per valutare l'incertezza di misura, si adotta l'approccio Top Down in base al quale l'incertezza combinata viene calcolata da dati di riproducibilità, senza far ricorso quindi a modelli matematici precostituiti.

La valutazione dell'incertezza segue modalità diverse in funzione della tipologia del metodo utilizzato.

Non avendo un metodo normalizzato con parametri di precisione assenti/incompleti a cui riferirsi ma avendo solo un metodo interno validato, non potendo eseguire prove su materiali di riferimento certificati (CRM) per la matrice acqua, non avendo ancora partecipato a confronti interlaboratorio (Collaborative Trials/Proficiency Tests) per la matrice acqua, è possibile, in base ai dati di validazione disponibili, utilizzare equazioni empiriche per il calcolo dell'incertezza di misura.

4.2.7.1. UTILIZZO DI EQUAZIONI EMPIRICHE

Si può assumere come riproducibilità del metodo quella che ad esso competerebbe secondo le equazioni empiriche di Horwitz, in funzione del livello di analita.

Tale riproducibilità può essere espressa come scarto tipo σ_H o come scarto tipo relativo $CV\%_H$.

Si considera l'equazione corrispondente a concentrazioni inferiori a 120 ppb, essendo che la concentrazione prevista in campioni di acqua è dell'ordine dei pg/L, e quindi lo scarto tipo riproducibilità secondo Horwitz è così espresso:

$$\sigma_H \text{ corretta Thompson} = 0,22 * c \quad (4.7)$$

dove

c = concentrazione dell'analita d'interesse nel campione

Deve valere il seguente criterio HORRAT (HORwitz RATio):

$$1/2 \sigma_H \leq s_r \leq 2/3 \sigma_H$$

Se il criterio è rispettato, allora σ_H fornisce una stima dell'incertezza composta del laboratorio.

Se u.m. è l'unità di misura del dato (y), il risultato della misura ottenuto da una singola prova può essere espresso come:

$$(y \pm 2\sigma_H) \text{ u.m.}$$

5. RISULTATI E CONCLUSIONI

5.1. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Per diossine e furani la tossicità equivalente (TE) è data dal prodotto della concentrazione del congenere per il suo fattore di tossicità equivalente (TEF).

La sommatoria delle tossicità equivalenti dà la tossicità totale corrispondente al contenuto di diossine e furani nel campione:

$$TEQ = \sum_{i=1}^n (C_i * TEF_i) \quad (5.1)$$

Usando la scala di tossicità internazionale, la tossicità equivalente viene indicata come I-TE (vd. Tabella 1.1).

5.2. ELABORAZIONE DEI RISULTATI ANALITICI

È noto che a causa delle particolari condizioni in cui PCDD/Fs si formano, la distribuzione e l'abbondanza relativa dei congeneri che compongono le famiglie di tali composti sono caratteristiche dello specifico processo da cui hanno avuto origine.

Ad esempio, le miscele di PCDD e PCDF derivanti dalle emissioni da impianti di combustione (sia industriali che autoveicolari) presentano un eccesso di PCDD rispetto ai PCDF, così come i reflui civili in cui tali composti sono presenti quale risultato del progressivo accumulo di PCDD/Fs di origine non specifica lungo la catena alimentare.

I PCDF sono invece preponderanti in altre attività industriali, quali, ad esempio, le produzioni in cui è coinvolto il cloro, sia come materia prima che come prodotto finale (impianti cloro-soda, produzione di cloruro di vinile e di cloroderivati organici volatili). Tale distribuzione è così peculiare che, per questi processi, possono prodursi contaminazioni ambientali caratterizzate da una distribuzione tipica: la cosiddetta "*impronta del cloro*".

I risultati analitici sperimentali riguardano le campagne di monitoraggio degli anni 2007-2008. Il confronto tra i valori complessivi di PCDD/F (espressi come I-TE) nelle diverse stazioni del BSL è riportato nella figura 5.1.

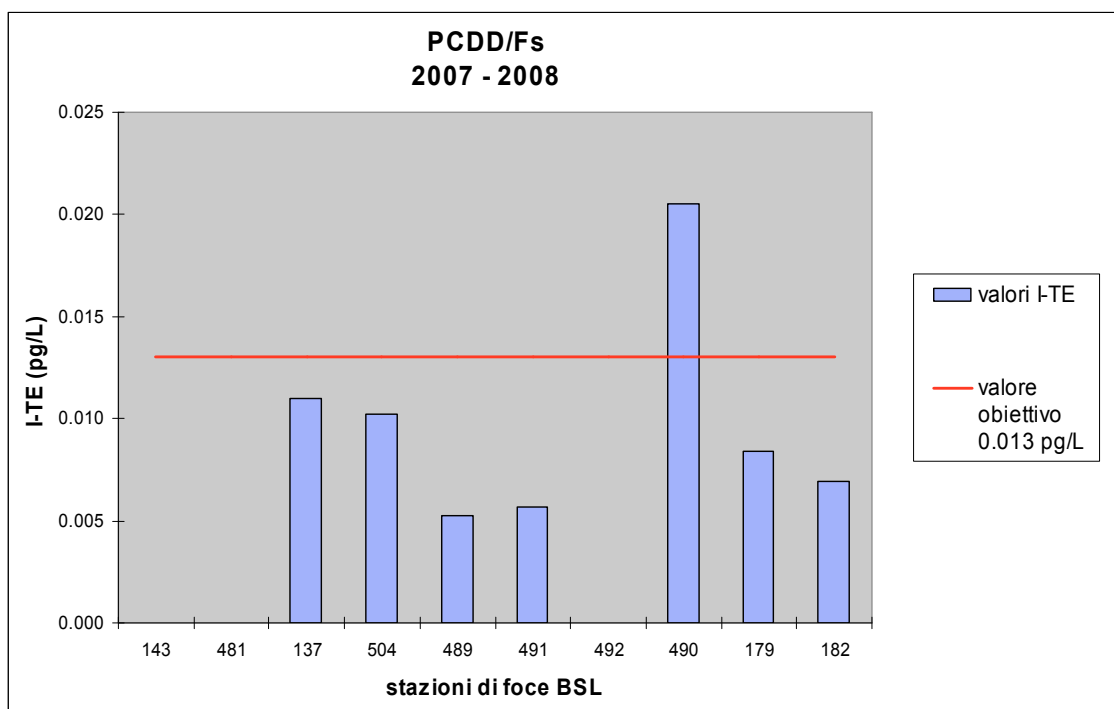


Figura 5.1: confronto tra le concentrazioni (esprese come I-TE) di PCDD/Fs nelle stazioni di foce - dati del biennio 2007-2008.

Come si può notare, nella maggior parte delle stazioni di foce del BSL il valore medio della concentrazione di PCDD/Fs espressi in tossicità equivalente (I-TE) non supera il valore obiettivo previsto dal Decreto Ronchi-Costa di 0.013 pg/L.

Le stazioni 143, 481 e 492 risultano prive di diossine/furani, perlomeno non contengono valori superiori ai limiti di rilevabilità.

L'unica stazione che presenta un costante superamento di tale valore risulta la 490 – Scolo Lusore situata a Marghera vicino alla zona industriale di Porto Marghera.

Il confronto tra l'abbondanza relativa dei congeneri consente di evidenziare alcune differenze tra le impronte nelle diverse stazioni.

Le figure seguenti riportano i profili di policlorodibenzodiossine/policlorodibenzofurani (PCDD/Fs) rilevati presso alcuni punti campionamento del BSL.

La maggior parte delle stazioni (137, 504, 489, 491) è caratterizzato dalla netta prevalenza di OCDD sugli altri congeneri con presenza in minor quantità di HpCDD (10-30%). L'impronta della diossina in tali stazioni è quella tipica dei generici processi di combustione e della contaminazione dovuta agli scarichi di tipo civile (es. Figura 5.2).

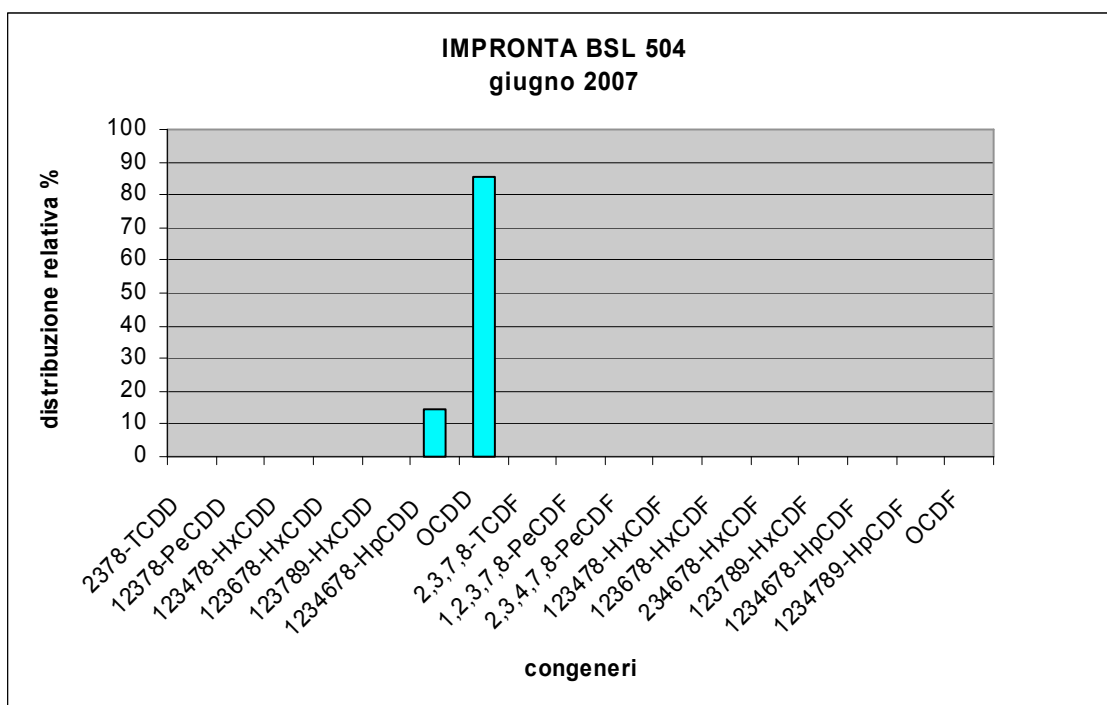


Figura 5.2: esempio di impronta di processi generici di combustione e reflui urbani.

Dall'esame delle impronte della stazione prossima all'area industriale di Porto Marghera (490) si può notare una prevalenza dell'OCDF (ca. 50% rispetto a tutti i congeneri) oltre ad aliquote inferiori di 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF (15-20%) e di OCDD (ca. 30%). Tale distribuzione risente della combinazione delle due principali fonti: Porto Marghera per quanto riguarda OCDF ed il contributo civile e urbano diffuso per quanto riguarda OCDD. Infatti la cosiddetta "impronta Marghera" ha un profilo in cui prevale l'OCDF (50-60% rispetto a tutti i congeneri), presenti in modo minore 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF e OCDD (10-20%). Tale stazione non è collocata all'interno della zona industriale ma nelle vicinanze, quindi la componente industriale probabilmente viene determinata sia dalle ricadute atmosferiche sia dagli scarichi industriali dovute all'attività dell'industria del cloro (Figura 5.3).

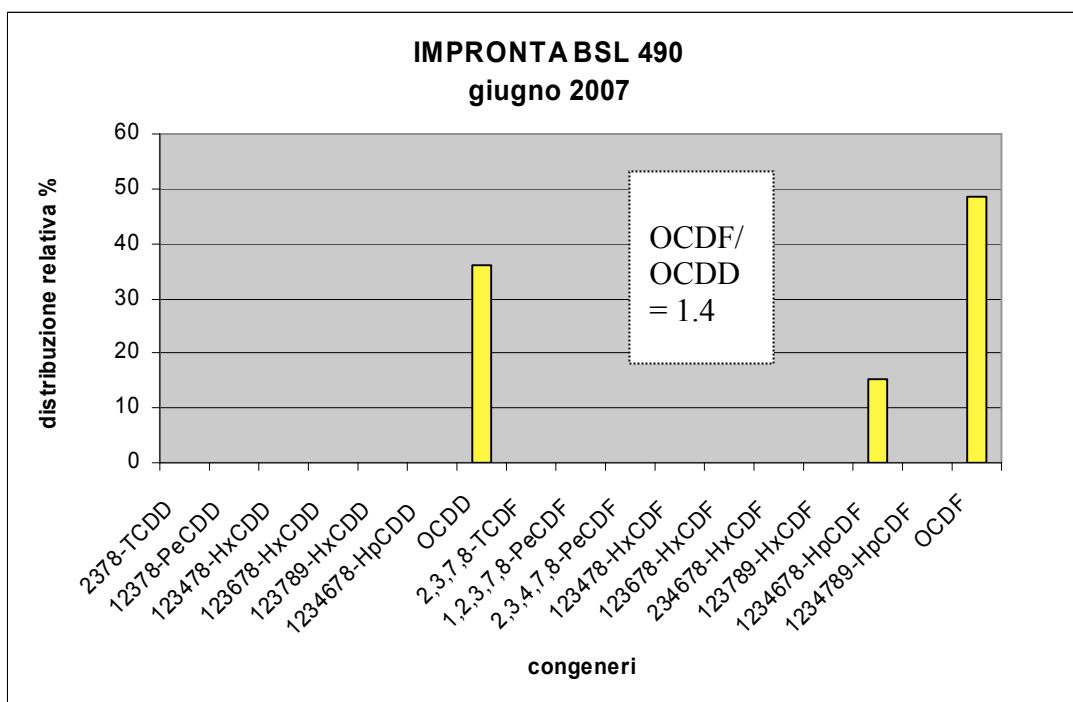


Figura 5.3: esempio di impronta della combinazione di processi industriali e di scarichi urbani.

Dalla figura seguente, impronta sempre della stazione 490 ma relativa al campionamento dell'anno successivo, è possibile osservare la persistenza dei microinquinanti.

Il rapporto OCDF/OCDD è un indice della natura dell'origine di tali composti e rimane inalterato col passare degli anni.

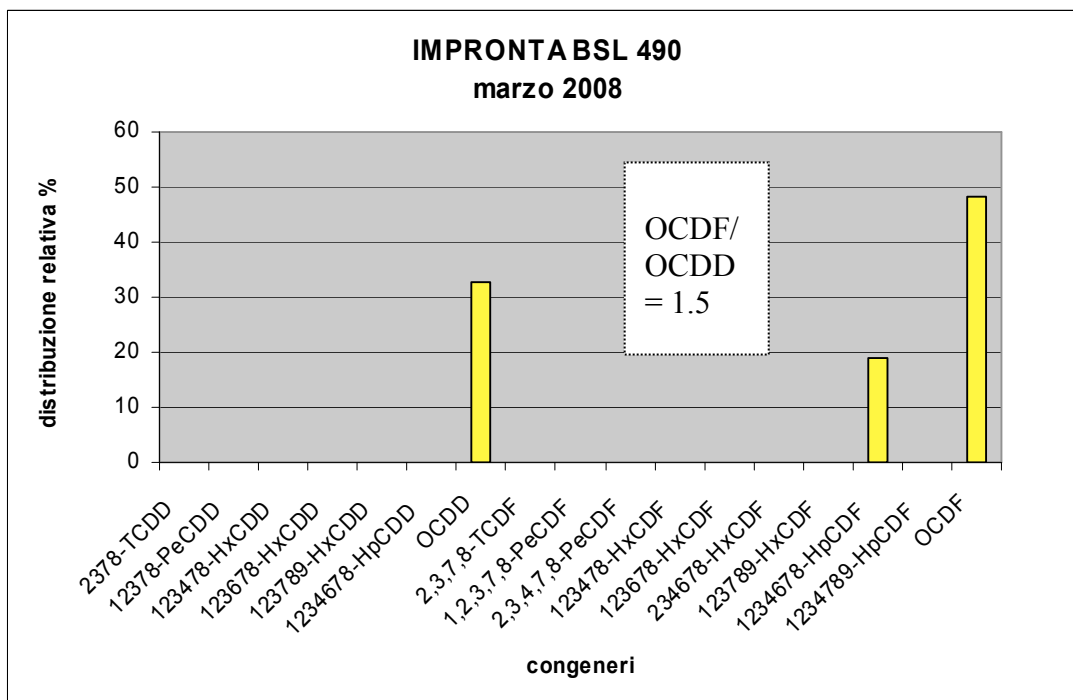


Figura 5.4: esempio di persistenza dei microinquinanti organici diossine/furani nel tempo.

5.3. CONCLUSIONI

Le diossine sono ormai largamente diffuse nell'ambiente a causa dello sviluppo industriale della seconda metà del secolo scorso e della presenza delle varie fonti antropiche. Purtroppo grazie alle proprietà chimico-fisiche di tali molecole, la distribuzione delle diossine è ubiquitaria, cioè il problema della emissione delle diossine non è più limitato alle vicinanze delle sorgenti di emissioni ma è diffuso in tutto l'ambiente circostante. Inoltre le diossine hanno le proprietà di persistere lungamente negli anni in diverse matrici ambientali (per es. acqua, aria, suolo) e di bioaccumularsi in particolare nelle parti grasse, quindi sono composti che facilmente possono entrare nella catena alimentare e rimanervi.

Le diossine sono comunque presenti nell'ambiente in quantità molto piccole (si parla di fentogrammi per litro nel caso della matrice acqua) anche distanti dalle fonti dirette di emissione. Concentrazioni così piccole sono di difficile rilevabilità e la loro analisi richiede costi e tempi elevati.

È necessario utilizzare strumentazione sempre più tecnologicamente avanzata per rispondere ai requisiti di rilevabilità richiesti dalla normativa e questo è possibile mediante la spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) unita alla meticolosa preparazione del campione.

La validazione del metodo di analisi ha dimostrato le prestazioni, elevata selettività ed l'affidabilità, della strumentazione ad alta risoluzione dando valori di limiti di rilevabilità e quantificazione pari al livello inferiore del campo di taratura, che sono di 0.25 pg/L per le Tetra-CDD/F, 1.25 pg/L per Penta-Esa-Epta-CDD/F e 2.5 pg/L per le Octa-CDD/F.

L'attività di monitoraggio delle acque del Bacino Scolante nelle stazioni di foce svolta nel corso degli anni 2007-2008 ha consentito di mettere in evidenza alcuni aspetti significativi di alcune zone prossime alla laguna di Venezia.

Si è riscontrato che la maggior parte dei siti di monitoraggio presenta una impronta in cui prevale l'OCDD, dovuta a generici processi di combustione ed agli scarichi di tipo civile. Solo la stazione 490 dello Scolo Lusore di Marghera presenta, con superamento del valore obiettivo dei 0.013 pg/L del Ronchi-Costa, anche 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF e OCDF, tipici di attività industriali.

L'attività di monitoraggio suggerisce lo spunto per il confronto coi dati ottenuti nelle campagne di monitoraggio svolte dall'ARPAV negli anni precedenti per osservare la persistenza di tali molecole nell'ambiente acquatico oppure l'andamento del contributo di microinquinanti nel tempo.

In parallelo a tale studio, si potrebbero accostare i dati dei PCBdl (anche'essi presenti in microtracce) ed individuare una eventuale la correlazione.

Sarebbe interessante inoltre mettere in relazione i risultati ottenuti dalla Sezione Antinquinamento del Magistrato alle Acque (SAMA) che ha svolto esclusivamente campionamenti in stazioni nella laguna di Venezia, con quelli ottenuti da ARPAV nelle

stazioni del BSL in modo da mettere in relazione i carichi di inquinanti provenienti dal bacino scolante e diretti in laguna con i carichi già presenti in laguna.

6. BIBLIOGRAFIA

- APAT, Rapporto febbraio 2006, *Diossine furani e PCB*
- ARPA Emilia Romagna, 2003, *Linee guida per la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell'incertezza di misura*, Bologna
- ARPAV, Rapporto sullo stato ambientale dei corpi idrici Anni 2003-2004, *Bacino Scolante nella laguna di Venezia*
- COLIN, BAIRD, Chimica Ambientale, Ed. Zanichelli
- COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE, 17 luglio 2006, *Proposta di direttiva del Parlamento Europeo e del Consiglio relativa a standard di qualità ambientale nel settore della politica delle acque e recante modifica della direttiva 2000/60/CE*, COM(2006), 397
- CONSORZIO PER LA GESTIONE DEL CENTRO DI COORDINAMENTO DELLE RICERCHE INERENTI IL SISTEMA LAGUNARE DI VENEZIA, 2007, *Manuale dei metodi analitici per il controllo ambientale di acque e sedimenti della Laguna di Venezia*, Ed. CORILA
- EPA, 1996, *Definition and Procedure for determination of the method detection limit*, 40 CFR 136, App. B, rev. 1.11
- EPA, Metodo 1613 Rev.B, 1994, *Tetra- through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS*
- GUERZONI S., RACCANELLI S., 2003, *La laguna ferita – Uno sguardo alla diossina e agli altri inquinanti organici persistenti (POP) a Venezia*, Ed. Cafoscarina
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH), 2005, *Validation of analytical procedures*, Q2(R1), Geneva www.ich.org
- IUPAC, 2002 Technical Report, *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis*, Pure Appl. Chem., 75, 835, www.iupac.org/reports/index.html
- LAVAGNINI I., MAGNO F., SERAGLIA R., TRALDI P., 2006, *Quantitative Applications of Mass Spectrometry*, Ed. Wiley
- MAV, Quaderni settembre 2007, *Un mare curabile – Conoscere i veleni della laguna di Venezia per risanare e prevenire*, Ed. Marsilio
- MINISTERO DELL'AMBIENTE di concerto con il MINISTERO DEI LAVORI PUBBLICI, Decreto del 23 aprile 1998, *Requisiti di qualità delle acque e caratteristiche degli impianti di depurazione per la tutela della laguna di Venezia*, G.U. n.140 del 18 giugno 1998
- SKOOG D. A., LEARY J. J., Chimica analitica strumentale, Ed. EdiSES
- THERMO FINNIGAN, *Functional Description Manual MAT 95 XP*
- THERMO FINNIGAN, *Operating Manual MAT 95 XP*
- THOMPSON M., 2000, *Analyst*, 125, 358-386
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005

UNI ISO 3534-1:2000, 3.12, 3.14, 3.15, 3.18, 3.23

UNI ISO 5725/1:2004, 3.7, 3.12

UNICHIM, 1999, *Manuale n.179/0: Linee guida per la validazione di metodi analitici nei laboratori chimici*

VIM 3.9, UNI CEI ENV 13005:2000, B.2.18 *Guida all'espressione dell'incertezza di misura (GUM)*

WISCONSIN DEPARTMENT OF NATURAL RESOURCES, Laboratory Certification Program, April 2006, *Analytical Detection Limit Guidance & Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits*

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio Dio per non avermi mai lasciato sola e per avermi dato la forza di credere di più in me stessa capendo ed essendo convinta del lavoro che stavo facendo.

Ringrazio la Prof.ssa R. Seraglia per la sua collaborazione e la sua competenza in spettrometria di massa.

Ringrazio l'Ing. S. Boato per avermi dato l'autorizzazione all'utilizzo dei dati ARPAV.

Ringrazio Emilia per il suo instancabile ottimismo.

Ringrazio Luciana per la sua competenza e per i consigli incisivi e azzeccati che mi hanno dato la possibilità di proseguire la parte sperimentale superando i momenti cruciali.

Ringrazio Sandro per la sua competenza e per avermi sopportato... non è semplice far stare due "cancri" fianco a fianco! Mi dispiace che proprio alla fine della carriera ti sia capitata una rompi come me!

Grazie a mio marito Diego, a Umberto ed a Mariella che, pur contro il loro interesse, mi hanno lasciata libera di scegliere cosa fare.

Grazie a mamma e papà che mi hanno lasciato studiare.

Grazie a Luca, Piero, Alvisè, Katia che senza sapere bene cosa stavo facendo all'università, mi hanno sempre chiesto come andava.

Grazie ai piccoli Marco e Luca che mi tirano su il morale.

Grazie alle mie amiche Irma, Emma, Elisa, Michela, Luana, Daphrose che mi hanno sostenuto con la loro unità e preghiera.

Grazie a Silvia e Chiara che mi hanno sempre sostenuto con la loro amicizia!

Grazie alla mia collega Sara con cui abbiamo condiviso le varie ansie.

Grazie ai miei colleghi Antonella, Filomena, Roberto che mi hanno dato un'occhiata alla tesi anche quando non era molto leggibile e mi hanno dato consigli sulla faticosa impaginazione!

Grazie a chi mi ha incoraggiato e che in questo momento non mi viene in mente! Mi scuso con tutti per essere stata "acida" in certi momenti, non era un comportamento volontario!

Grazie all'elettromoltiplicatore di non aver "tirato le strasse" prima della fine delle analisi! Non so dove ho trovato le energie per estrarre le ultime 10 BSL in tempi da record ma... ne è valsa la pena!