



Università
Ca'Foscari
Venezia

Corso di Laurea magistrale
in Chimica e Tecnologie Sostenibili

Tesi di Laurea

***Sviluppo di un metodo GC/MS-TQ
per l'identificazione e l'analisi dei pesticidi
inseriti nella Direttiva Europea 2013/39/UE
al fine di monitorare le acque del centro storico di Venezia
durante e dopo il periodo di lockdown
dovuto all'emergenza da Covid-19***

Relatore

Prof. Gambaro Andrea

Dott. Carrer Claudio

Laureanda

Rizzi Beatrice

Matricola 854867

Anno Accademico

2019/2020

SOMMARIO

SOMMARIO.....	3
INTRODUZIONE	5
1 NORMATIVE RELATIVE AI FITOSANITARI	9
2 SCOPO DELLA TESI	11
3 CLASSIFICAZIONE DEI PESTICIDI	13
4 ASPETTI TEORICI	19
4.1 Cenni teorici sulla gas cromatografia	19
4.2 Cenni teorici sulla spettrometria di massa	22
4.2.1 Sorgente	23
4.2.2 Analizzatore	24
4.3 Strumentazione utilizzata in questo lavoro.....	26
5 MATERIALI E METODI	29
5.1 Materiali utilizzati.....	29
5.2 Metodi di riferimento	33
5.3 Preparazione dei campioni	34
5.3.1 Campionamento.....	34
5.3.2 Preparazione Vetreria	38
5.4 Estrazione	39
5.4.1 Estrazione liquido-liquido utilizzata in questo lavoro	39
5.4.2 Tecniche di estrazione utilizzate per analisi GC-MS per la determinazione dei pesticidi in matrice	41
5.4.3 Confronto tra i metodi presi in esame	53
5.5 Confronto delle tecniche strumentali usate con quelle presenti in letteratura ...	57
6 MESSA A PUNTO DEL METODO STRUMENTALE	61
6.1 Studio delle transizioni di massa caratteristiche	63

6.2	Smart tune	70
6.3	Condizioni operative	72
6.4	Validazione del metodo	73
6.5	Ottimizzazione metodo iniezione	80
7	METODI ANALITICI PER ACLONIFEN E DICOFOL	83
7.1	Aclonifen.....	83
7.2	Dicofol.....	85
8	RISULTATI E DISCUSSIONE DEI DATI.....	93
8.1	Risultati ottenuti dall'analisi di 12 campioni di acqua di laguna.....	94
	CONCLUSIONI.....	105
	BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	109

INTRODUZIONE

La laguna di Venezia è localizzata a nord ovest del bacino settentrionale del Mar Adriatico ed è compresa tra i fiumi Brenta a sud e Sile a nord. Considerata come uno degli ecosistemi lagunari più estesi (550 Km² di superficie) e più importanti d'Europa e dell'intero bacino Mediterraneo, è un'area umida naturale con un immenso patrimonio biologico, faunistico e floristico e con alcune specie animali e vegetali rare o minacciate d'estinzione. Della superficie lagunare totale, circa l'80% risulta coperto in maniera stabile da acqua, il 10% da barene e il 5% da isole.

In questo luogo si trovano condensate eccellenze archeologiche, architettoniche, naturalistiche e della cultura tradizionale e, più che altrove, qui si percepisce la fragilità e la complessità dell'insieme.

I confini lagunari verso terra sono marcati da opere umane il cui riferimento principale è la "conterminazione lagunare". Tale opera è costituita da 129 cippi che segnano il confine tra la laguna e la terraferma. Verso il mare la laguna di Venezia è delimitata da un cordone litoraneo costituito, da sud a nord, dai seguenti lidi: Sottomarina, Pellestrina, lido di Venezia e Cavallino, separati tra loro dalle tre bocche di porto di Chioggia, Malamocco e Lido.

Del territorio dell'ecosistema lagunare fa parte il bacino scolante che si estende per oltre 2000 km²; è un ambito territoriale definito da un insieme di corpi idrici che defluiscono nella laguna di Venezia con deflusso naturale o in modo meccanicamente gestito, tramite idrovore. A questo si aggiunge anche l'Area di Ricarica che non scola superficialmente ma alimenta tramite le falde sotterranee le risorgive dei corpi idrici settentrionali del bacino.

I fattori di criticità del bacino lagunare sono numerosi e molteplici, naturali ed antropici, e hanno da sempre reso questo ambiente un luogo dinamico e complesso.

Dalla seconda metà del secolo scorso si è sviluppata una crescente attenzione per lo studio e l'approfondimento dei fenomeni che regolano l'ambiente lagunare; dal degrado morfologico alla crescente forza del moto ondoso, dalla qualità scadente delle acque e dei sedimenti lagunari al rilascio di inquinanti provenienti dall'area industriale di Porto Marghera.

Il rapporto sullo stato ecologico della Laguna del 2008 ha raccolto le informazioni disponibili derivanti dai vari monitoraggi ambientali e da diverse pubblicazioni

scientifiche per mettere in luce le variazioni dello stato ecologico della laguna di Venezia.

La contaminazione dovuta ai microinquinanti organici risulta essere uno dei punti più preoccupanti essendo i POPs (Persistent Organic Pollutants) i più persistenti. Questo inquinamento è legato all'immissione diretta di scarichi industriali e civili, al dilavamento di suoli contaminati, alle precipitazioni atmosferiche e allo scarico di rifiuti e residui di lavorazione avvenuti nel passato.

I pesticidi organoclorurati, nel rapporto del 2008, risultavano essere più presenti nelle aree che si affacciano alla gronda lagunare, in particolare nel bacino nord e centro nord, cioè Porto Marghera e le zone agricole retrostanti la laguna.

Dal 5° censimento generale dell'Agricoltura attuato dall'Istat, si evince che le aziende presenti nel bacino scolante sono poco più di 55 mila e, dal punto di vista dell'utilizzazione agricola, prevalgono seminativi e orticoltura, quest'ultima localizzata soprattutto nelle zone costiere. Un'analisi svolta nel 2007 ha messo in evidenza la scarsa propensione delle aziende agricole presenti in questo territorio alle pratiche a basso impatto ambientale; la necessità di avere un'elevata redditività possedendo dimensioni aziendali limitate, spinge all'utilizzo di input chimici per intensificare la produttività avendo così un maggior guadagno.

Uno degli obiettivi attuali è la conservazione della natura nel particolare contesto della laguna veneta garantendo il mantenimento delle attività umane, che non può prescindere dall'impegno per l'arresto dei processi di degrado ambientale ed il recupero dell'equilibrio dinamico dell'ecosistema lagunare. L'eccezionale valenza di questo territorio merita di essere valorizzata e protetta tanto che tutta l'area lagunare è stata designata come Patrimonio mondiale dell'umanità dall'UNESCO.^{1 2 3 4}

Le attività in materia di tutela delle acque della laguna di Venezia dall'inquinamento, sono di competenza dello Stato rappresentato dal Provveditorato Interregionale alle Opere Pubbliche per il Triveneto (Ex Magistrato alle Acque) e sono svolte dall'Ufficio Tecnico per l'Antinquinamento, già istituito come "Sezione Antiquinamento" con DPR1186/76.

Questa sezione, nei suoi diversi ruoli, si occupa di sorveglianza sull'intera laguna, di tutela delle acque dall'inquinamento e di esecuzione di monitoraggi dell'ambiente lagunare mediante campagne di misura finalizzate alla verifica dello stato delle acque lagunari rispetto agli obiettivi di qualità stabiliti dalla normativa.

L'Ufficio, inoltre, ha realizzato e gestisce una rete di stazioni di monitoraggio automatico delle acque lagunari (SAMANET) che consiste in 10 stazioni per la misura dei parametri chimico - fisici delle acque lagunari (livello di marea, temperatura, salinità, ossigeno disciolto, clorofilla, torbidità).

Queste caratteristiche e il grado di contaminazione delle acque e dei sedimenti della laguna veneta sono stati oggetto, fin dalla metà del secolo scorso, di numerosi ed approfonditi studi; nell'ultimo decennio, in particolare, a seguito della definizione da parte del Ministero dell'Ambiente degli obiettivi di qualità delle acque della laguna, il Magistrato alle Acque ha avviato il monitoraggio sistematico della qualità delle acque lagunari attraverso periodiche campagne analitiche in 24 punti della laguna, tra cui le 10 stazioni fisse precedentemente citate.^{5 6}

Il lockdown nei mesi di Marzo e Aprile, causato dall'emergenza Covid-19, ha avuto effetti negativi sulla società e sull'economia ma ha mostrato alcuni effetti positivi sull'ambiente che, in quei mesi, sembrava tornare a "respirare". Tali effetti sono stati osservati anche nel Veneziano. Infatti, come conseguenza delle misure restrittive e di isolamento messe in atto dal 10 Marzo 2020, il traffico ordinario caratteristico nei canali di Venezia, si è arrestato. Nelle settimane successive molti social media e molti giornali hanno riportato una trasparenza nelle acque lagunari che comunemente non viene osservata. L'emergenza Covid-19 ha quindi fornito un'importante opportunità per osservare l'ambiente lagunare senza traffico urbano, senza turismo e attività commerciali. Dallo studio di Braga et al. (2020), è emerso che le eccezionali condizioni dell'acqua osservate sono probabilmente effimere e dovute principalmente alla diminuzione di turbolenze e di sospensione delle particelle solitamente causate dal passaggio di barche e navi, alla scarsità di precipitazioni nei primi mesi del 2020 che hanno portato a un minor deflusso degli affluenti lagunari e al ciclo di crescita dei fitoplancton che hanno reso la trasparenza dell'acqua più elevata.⁷

Il Provveditorato Interregionale alle opere pubbliche ha comunque sfruttato questa straordinaria situazione per monitorare e osservare i possibili cambiamenti nei rii di Venezia, analizzando le concentrazioni di alcuni microinquinanti organici ogni tre mesi a partire dall'inizio del mese di Maggio 2020 fino a Marzo 2021.

Capitolo 1

NORMATIVE RELATIVE AI FITOSANITARI

Nella ricerca di sostanze inquinanti, alcuni composti risultano di particolare interesse in quanto inseriti nell'elenco delle sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque.

Nel 2009 il Parlamento europeo ha emanato un regolamento relativo all'immissione sul mercato dei fitosanitari riconoscendo il loro uso come metodo principale nella produzione vegetale per la necessità di migliorare la produzione agricola. I prodotti fitosanitari possono, però, avere anche effetti non benefici e il loro utilizzo può comportare rischi e pericoli per gli esseri umani, gli animali e l'ambiente, soprattutto se immessi nel mercato senza essere stati testati ed autorizzati. Questo regolamento si poneva quindi come obiettivo quello di assicurare un elevato livello di protezione di tutte le parti a rischio, salvaguardando la competitività dell'agricoltura. Secondo questa Direttiva i prodotti fitosanitari sono definiti come "preparati contenenti una o più sostanze attive che hanno lo scopo di proteggere i vegetali dagli organismi nocivi o di prevenirne gli effetti, di eliminare o controllare l'accrescimento delle piante indesiderate o infestanti". Influiscono, inoltre, sui processi vitali e sulla conservazione dei prodotti vegetali portando ad un chiaro beneficio nella loro produzione senza alcun effetto nocivo per la salute umana, animale e ambientale.

Nella Direttiva Europea 2013/39/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 12 agosto 2013, sono state identificate alcune sostanze per le quali gli Stati membri devono effettuare un monitoraggio specifico al fine di garantire o conseguire un buono stato chimico delle acque superficiali e superficiali interne (per acque superficiali interne si intendono fiumi, laghi e corpi idrici artificiali o fortemente modificati).

La Direttiva del 2013 modifica la Direttiva Quadro del 2000/60/CE che istituiva un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque, delineava una strategia per combattere l'inquinamento idrico e, a questo scopo, individuava alcune sostanze prioritarie, cioè sostanze che rappresentano un rischio significativo per l'ambiente acquatico, tra cui erano già stati inseriti i fitosanitari. Nel 2008 un'altra Direttiva ha stabilito gli standard di qualità ambientale (SQA) per le sostanze prioritarie individuate e, nel 2013, è stato ampliato l'elenco delle sostanze prioritarie, sono stati decisi nuovi

SQA per queste sostanze e rivisti quelli precedentemente fissati. Lo standard di qualità ambientale è la concentrazione di un particolare inquinante o gruppo di inquinanti nelle acque, nei sedimenti e nel biota, che non deve essere superata, al fine di tutelare la salute umana e l'ambiente. Lo SQA può essere riferito alla media annuale (SQA-AA) e alla massima concentrazione ammissibile (SQA-CMA). La conformità a questi valori garantisce il buono stato chimico per un corpo idrico superficiale. ^{8 9 10}

Capitolo 2

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo iniziale di questa tesi era quello di sviluppare e mettere a punto un metodo GC/MS-MS per l'analisi di pesticidi in matrice acqua salata.

I campioni da utilizzare sono stati prelevati durante e dopo il lockdown per un progetto di monitoraggio puntuale all'interno dei rii di Venezia volto a verificare se il periodo di chiusura totale avesse portato a cambiamenti significativi nella qualità dell'acqua lagunare.

Questo studio è stato condotto presso il laboratorio CSMO del Provveditorato Interregionale alle Opere Pubbliche per il Triveneto ed ha quindi tenuto conto delle esigenze interne del laboratorio, considerando i limiti previsti dalla Legge in materia di tutela dell'ambiente.

Durante lo svolgimento del progetto si sono presentate alcune problematiche dovute sia alla pandemia da Covid-19, sia a un prolungato malfunzionamento della strumentazione che è stata utilizzata per la messa a punto del metodo analitico.

È stato quindi necessario correggere l'obiettivo dello studio, focalizzando l'attenzione sul confronto tra le tecniche pre analitiche e strumentali esistenti in letteratura con quelle previste da questa tesi. Sono stati presi in considerazione studi riguardanti la matrice acqua per stabilire quale potesse essere il metodo migliore per garantire l'attuabilità delle Direttive, verificandone i limiti.

Capitolo 3

CLASSIFICAZIONE DEI PESTICIDI

Spesso il termine pesticida è usato come sinonimo di fitosanitario; in realtà ha un significato più ampio che comprende sia i prodotti fitosanitari che i biocidi. La differenza tra questi ultimi sta nel loro utilizzo e scopo. Infatti, i fitosanitari sono utilizzati in agricoltura per proteggere le colture, mentre i biocidi non vengono usati nelle coltivazioni ma per debellare organismi nocivi e portatori di malattie come insetti, topi e ratti. ¹¹

I pesticidi possono essere classificati in diversi modi che si basano principalmente su:

- Natura chimica dei composti
- Scopo di utilizzo
- Organismo target

Considerando la loro struttura chimica, si dividono in:

- *Organoclorurati*

Gli organoclorurati (OC) sono un gruppo di composti clorurati ampiamente usati come pesticidi, si stima che il 40% dei pesticidi utilizzati appartengano a questa categoria. Appartengono alla classe dei POPs e hanno quindi un'elevata persistenza nell'ambiente ma il loro basso costo e la capacità di proteggere da molti parassiti differenti li rende molto comuni. Tra i fitosanitari analizzati in questo studio fanno parte di questa famiglia i DDT, aldrin, dieldrin, isodrin, clordano, dicofol, metoxyclo, eptacloro ed endosulfan. Alcune strutture dei composti elencati vengono rappresentate di seguito nelle *Figure 3.1 - 3.4*.

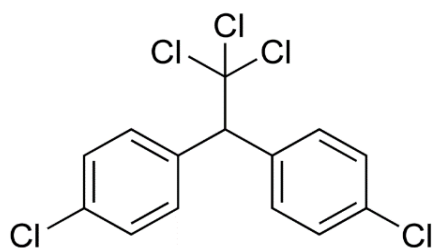


Figura 3.1 - Struttura DDT

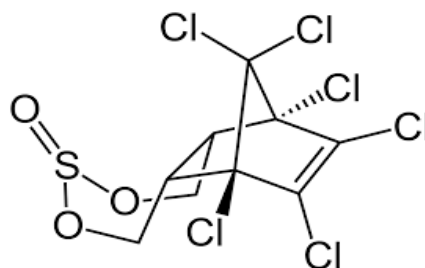


Figura 3.2 - Struttura endosulfan

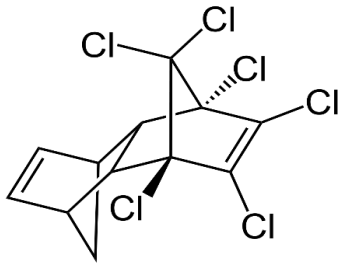


Figura 3.3 - Struttura aldrin

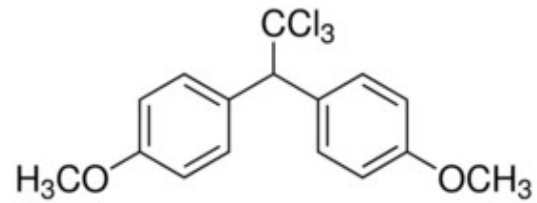


Figura 3.4 - Struttura metoxycloro

• Organofosfati

Gli organofosfati sono esteri dell'acido fosforico e come pesticidi agiscono rendendo irreversibilmente inattivo l'enzima acetilcolinesterasi. Tali sostanze degradano facilmente per idrolisi quando esposti alla luce ma, piccole quantità, sono state rilevate nel cibo e nell'acqua.

Fanno parte di questo gruppo di fitosanitari fention, malation, dimetoato e diclorvos. Le strutture di questi composti vengono riportate (Figura 3.5 - 3.8).

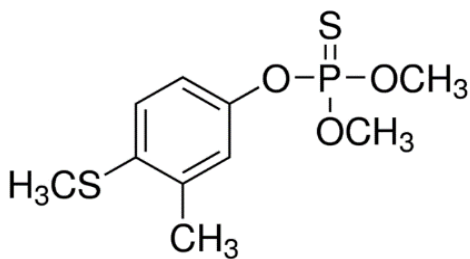


Figura 3.5 - Struttura fenthion

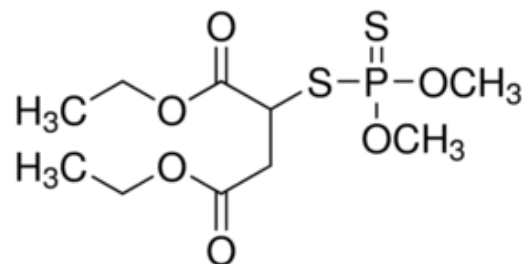


Figura 3.6 - Struttura malathion

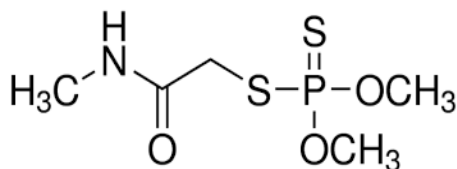


Figura 3.7 - Struttura dimetoato

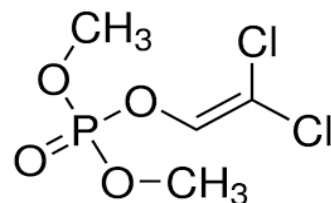


Figura 3.8 - Struttura diclorvos

- *Fenilammidi*

I fenilammidi sono sostanze che mostrano un'attività elevata nell'eradicazione fungina; hanno un impatto sulla mitosi e sulla divisione cellulare nei funghi bersaglio. Queste sostanze entrano nella catena alimentare e danneggiano quindi anche l'essere umano. Alaclor e trifluralin rientrano in questa classe di composti e sono raffigurati nelle *Figure 3.9* e *3.10*.

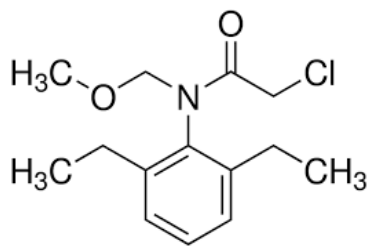


Figura 3.9 - Struttura alaclor

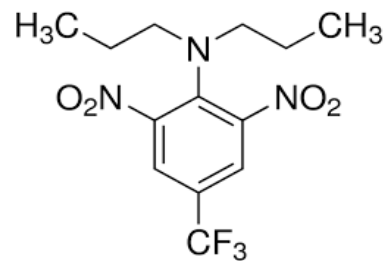


Figura 3.10 - Struttura trifluralin

- *Triazinici*

I composti che fanno parte di questa categoria sono erbicidi ed è stato scoperto che elevate concentrazioni di questi fitofarmaci inibiscono la via del catabolismo vegetale.

In questo studio sono stati analizzati alcuni componenti di questo gruppo come atrazina, simazina e terbutrina. Due di queste sono rappresentate nelle *Figure 3.11* e *3.12*.

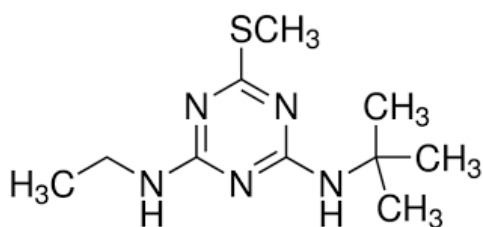


Figura 3.11 - Struttura terbutrina

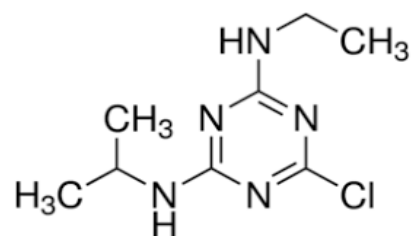


Figura 3.12 - Struttura simazina

Carbammati, piretroidi, fenossialchilati, acidi benzoici, ftalimmidi, dipiridi e altri pesticidi formano ulteriori categorie che non vengono analizzate in questo lavoro.¹²

In questa tesi, oltre a cercare di corrispondere ai limiti estremamente restrittivi della Direttiva, è stata posta un'attenzione particolare su aclonifen e dicofol, per i quali lo standard di qualità ambientale è molto basso.

Il primo è un pesticida ancora in uso, in particolare per trattamenti fitosanitari di patate, piselli, pomodori, sorgo, girasole, mais e carote.¹³

Il secondo, pur non essendo più attualmente in uso in Europa, resta un sorvegliato speciale poiché è simile al DDT per struttura, persistenza, bioaccumulo e per gli effetti negativi che può avere sull'uomo, sugli animali e sull'ambiente, in particolare sugli organismi acquatici, con effetti di lunga durata.

In numerosi studi è stata inoltre dimostrata la difficoltà della determinazione del dicofol in gascromatografia poiché degrada in iniettore formando numerosi metaboliti, il principale dei quali è il diclorobenzofenone (DCBP).^{14 15 16}

Nella *Tabella 3.1* vengono riportati i valori di SQA citati nella Direttiva 2013/39/EU; per la laguna di Venezia si fa riferimento ai valori riportati in corrispondenza di "altre acque di superficie".

Tabella 3.1 – Standard di qualità ambientale per prodotti fitosanitari stabiliti dalla Direttiva 2013/39/EU

Denominazione sostanza	SQA-AA ^(a) Acque superficiali interne (µg/L)	SQA-AA ^(a) Altre acque di superficie (µg/L)	SQA-CMA ^(b) Acque superficiali interne (µg/L)	SQA-CMA ^(b) Altre acque di superficie (µg/L)
DICLORVOS	6×10^{-4}	6×10^{-5}	7×10^{-4}	7×10^{-5}
ISOPROTURON	0.3	0.3	1	1
Σ DDT (2,4-DDT, 2,4 DDD, 4,4' DDD, 2,4 DDE, 4,4 DDE)	non applicabile ^(c)	0.025	0.025	non applicabile ^(c)

DICOFOL	1.3x10 ⁻³	3.2x10 ⁻⁵	non applicabile ^(c)	non applicabile ^(c)
ACLONIFEN	0.12	0.012	0.12	0.012
∑ ANTIPARASSITARI (ALDRIN, ENDRIN, DIELDRIN, ISODRIN)	0.01	0.005	non applicabile ^(c)	non applicabile ^(c)
4,4' DDT	0.01	0.01	non applicabile ^(c)	non applicabile ^(c)
ALFA-ENDOSULFAN BETA-ENDOSULFAN	0.005	0.0005	0.01	0.004
EPTACLORO ED EPTACLORO EPOSSIDO	2x10 ⁻⁷	1x10 ⁻⁸	3x10 ⁻⁴	3x10 ⁻⁵
SIMAZINA	1	1	4	4
ATRAZINA	0.6	0.6	2	2
TERBUTRINA	0.065	0.0065	0.34	0.034
CHINOSSIFEN	0.15	0.015	2.7	0.54
CLROFENVINFOS	0.1	0.1	0.3	0.3

(a) Media annuale

(b) Concentrazione massima ammissibile

(c) Per questa sostanza sono disponibili informazioni insufficienti per fissare un SQA-CMA

Altri fitosanitari sono citati invece nella Direttiva Ministeriale del 23 Aprile 1998 (Ronchi Costa) e altri ancora nel Decreto Ministeriale n.56 del 14 Aprile 2009, e devono essere controllati specificatamente nell'ambito della Laguna di Venezia.

La *Tabella 3.2* riporta i valori di SQA stabiliti da queste direttive. ¹⁷

Tabella 3.2 - Standard di qualità ambientale per prodotti fitosanitari stabiliti dalla Direttiva Ministeriale 23 Aprile 1998 e dal Decreto Ministeriale 14 Aprile 2009

Denominazione della sostanza	SQA-AA (µg/L)
CLORDANO	0.001
DEMETON	0.01
AZINFOS METILE	0.01
MEVINFOS	0.01
ALACLORO	0.3
DEMETON-O	0.01
TRIFLURALIN	0.03
FENITROTION	0.01
MALATION	0.01
CLORPIRIFOS	0.03
METOSSICLORO	0.1
PARATION ETILE	0.01
PARATION METILE	0.01
AZINFOS METILE	0.01
DIMETOATO	0.2
TERBUTILAZINA	0.2

Capitolo 4

ASPETTI TEORICI

4.1 CENNI TEORICI SULLA GAS CROMATOGRAFIA

La cromatografia è un metodo continuo utilizzato per la separazione, l'identificazione e la determinazione di componenti in miscele complesse. Attraverso questo metodo di separazione, le sostanze da separare vengono distribuite tra due fasi: una fase mobile e una stazionaria. La prima può essere un gas, un liquido o un fluido supercritico e, in particolare, nel caso della gascromatografia, è un gas inerte come idrogeno, elio, azoto o argon.

La fase mobile viene fatta scorrere su una fase stazionaria che viene posta sulle pareti di una colonna. La tecnica si basa sulla ripartizione degli analiti che hanno diversa affinità con le fasi, e grazie a questa differenza, si separano. Gli analiti vengono più o meno trattenuti e avviene quindi una migrazione differenziale per cui alcuni si muovono più lentamente di altri; in questo modo si separano in bande discrete.

Uno dei parametri più importanti è il tempo di ritenzione (t_R) che è specifico per ogni analita ed è definito come il tempo trascorso tra l'iniezione dell'analita e il suo arrivo al rivelatore.

Da un'analisi cromatografica si ottiene un cromatogramma in cui gli analiti sono identificati da picchi di forma gaussiana; la loro area è proporzionale alla concentrazione dei composti in esame.

Quando due sostanze hanno tempi di ritenzione simili, può accadere che i picchi si sovrappongano rendendo impossibile il riconoscimento delle stesse. Per risolvere questo problema si possono variare i tempi di ritenzione e l'efficienza, che è regolata principalmente dal flusso in colonna. L'efficienza viene misurata attraverso due parametri: il numero di piatti teorici (N) e l'altezza del piatto (H). H è dato dalla somma di alcune costanti che tengono in considerazione i fenomeni di diffusione e di trasferimento di massa. N , invece, è il rapporto tra la lunghezza della colonna (L) e H .

La risoluzione (R_s) è la proprietà più importante della cromatografia poiché è indice della bontà della separazione degli analiti. R_s è legata a N , al fattore di capacità (k') e

al fattore di selettività (α). Sia k' che α sono parametri adimensionali; il primo misura il tempo che un composto impiega ad attraversare la colonna in rapporto al tempo impiegato da un composto non trattenuto. Il secondo, invece, determina la capacità di un sistema di ottenere picchi separati.

Oltre alla sovrapposizione dei picchi, un altro problema che si incontra sperimentalmente, è quello dei picchi asimmetrici. Infatti, solo idealmente essi sono delle perfette curve gaussiane: in realtà possono presentare fenomeni di *fronting* o di *tailing* in base al fattore di asimmetria (A_s). A_s è dato dal rapporto b/a , dove b è la verticale che passa per il massimo del picco e interseca la base, mentre a è l'ampiezza del picco al 10% dell'altezza.

Questi fenomeni possono accadere per diversi fattori come ad esempio un'iniezione troppo lenta, un adsorbimento degli analiti sulla fase stazionaria, reazioni chimiche che possono avvenire all'interno della colonna o un sovraccarico della fase stazionaria.

Un gascromatografo è composto da tre parti fondamentali: iniettore, colonna e rivelatore. In *Figura 4.1.1* si può osservare lo schema a blocchi di un gascromatografo.

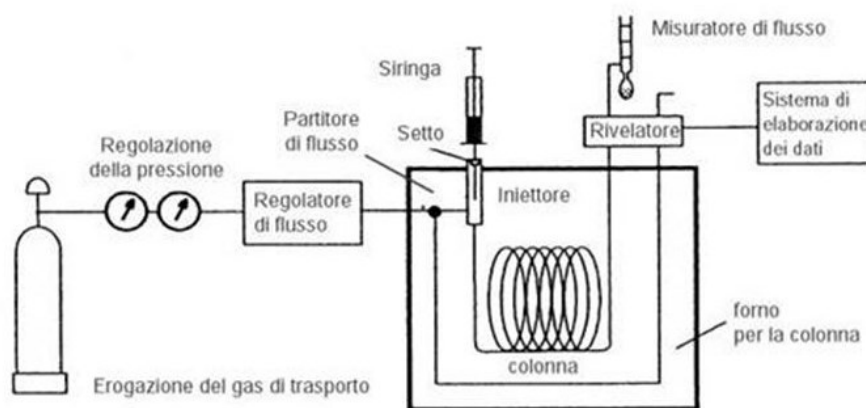


Figura 4.1.1 - Schema a blocchi di un gascromatografo ¹⁸

L'iniettore può essere di diverse tipologie:

- *On column*: è un iniettore a freddo in cui si trova una siringa che inietta direttamente in colonna, senza una preventiva vaporizzazione.
- *Split/splitless*: è un iniettore a caldo, la temperatura deve essere maggiore della temperatura di ebollizione dell'analita più altobollente. In questo caso, si può decidere se lavorare in modalità *split* e quindi *splittare* parte della soluzione iniettata, o se lavorare in modalità *splitless* facendo entrare in colonna tutto il

volume iniettato, compreso il solvente. Nel primo caso, i picchi sono più stretti rispetto all'*on column* ma più bassi, essendo la quantità di analita iniettato inferiore. Nel secondo caso, peggiora la separazione cromatografica e quindi anche la forma dei picchi.

- Vaporizzazione a temperatura programmata (*Programmed temperature vaporization*, PTV): è un iniettore a freddo con cui si può eseguire una programmata di temperatura, cosa che risulta vantaggiosa perché in questo modo si riesce ad eliminare il solvente. Infatti, il solvente scelto ha una temperatura di ebollizione minore degli analiti e alzando la temperatura è il primo a passare in forma gassosa, si mescola alla fase mobile e si fa uscire mediante una valvola. La temperatura, in seguito, continua ad aumentare facendo vaporizzare via via tutti gli analiti.

Si può decidere di accoppiare la tecnica cromatografica a una spettroscopica, rendendo più efficiente il riconoscimento degli analiti.

Si può facilmente accoppiare fisicamente un gascromatografo con uno spettrometro di massa attraverso una o più pompe di aspirazione, poiché gli analiti in uscita dalla colonna si trovano in fase gassosa. Tali sistemi di aspirazione, permettono il passaggio dei gas da una situazione di alta pressione a una di vuoto.

4.2 CENNI TEORICI SULLA SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è una tecnica utilizzata per analisi qualitative e quantitative, e fornisce diverse informazioni come la struttura di molecole complesse, i rapporti isotopici e il peso molecolare.

Uno spettrometro di massa è formato principalmente da tre parti: la sorgente, l'analizzatore e il detector. Nella sorgente l'analita viene volatilizzato e frammentato in modo da ottenere ioni carichi, solitamente positivi. L'analizzatore distingue e analizza i frammenti in base al rapporto massa/carica (m/z) e il detector misura ciò che arriva dall'analizzatore.

Nella *Figura 4.2.1* viene mostrato lo schema a blocchi di un generico spettrometro di massa.

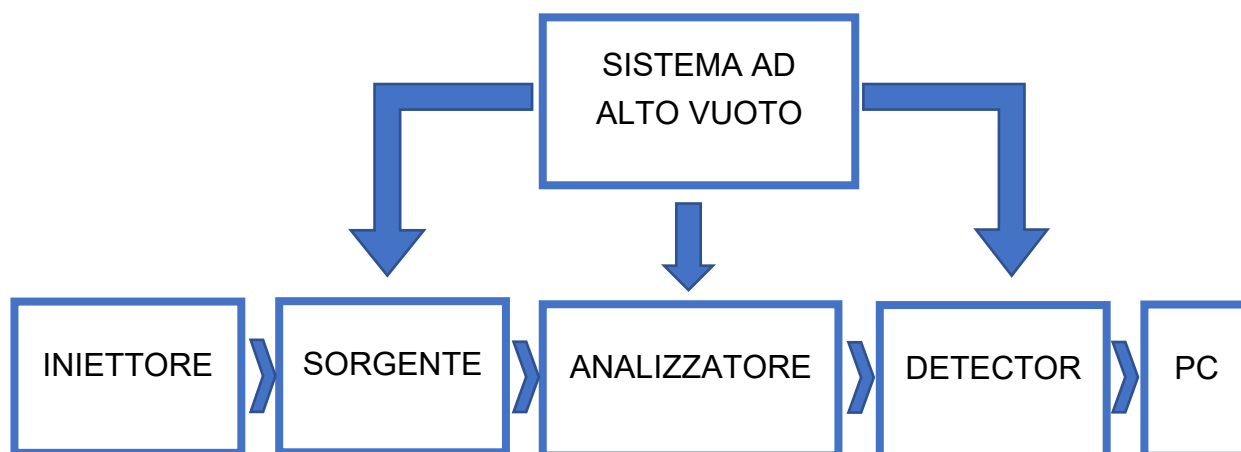


Figura 4.2.1 - Schema a blocchi spettrometro di massa

In sintesi, il campione viene inizialmente ionizzato e in seguito a questo processo si possono generare frammenti carichi che vengono poi separati in base al loro rapporto massa su carica. Da qui gli ioni arrivano a un rivelatore in grado di identificarli e si ottiene uno spettro che indica l'abbondanza relativa in funzione del rapporto massa/carica.

4.2.1 Sorgente

Il primo step è quindi la ionizzazione. Le sorgenti si dividono in hard e soft in base alla quantità di ioni che riescono a produrre. Con le prime si ottengono spettri con un elevato numero di masse prodotte, che si traduce in un elevato numero di picchi, e l'intensità dello ione molecolare è bassa. Con le altre, invece, si producono poche masse, quindi si vedono pochi picchi, ma l'intensità dello ione molecolare è elevata.

La sorgente a impatto elettronico (EI) è una sorgente hard in cui la ionizzazione del campione avviene per bombardamento elettronico. Questo avviene grazie alla presenza di un filamento che genera elettroni per effetto termico-ionico. Questi vengono condotti all'interno di una camera di ionizzazione (*Ion Volume*) dove, ortogonalmente al flusso di elettroni, passano le molecole, provenienti dalla colonna cromatografica, già in fase gassosa, che vengono così bombardate.

L'energia degli elettroni è solitamente di 70 eV; questo permette di avere un buon segnale per tutti i composti e di poter fare un confronto con librerie universali di spettri di massa.

Per le analisi quantitative, invece, si deve scegliere un valore ottimale di differenza di potenziale in modo da massimizzare il segnale.

In *Figura 4.2.1.1* viene mostrato lo schema di una sorgente a impatto elettronico.

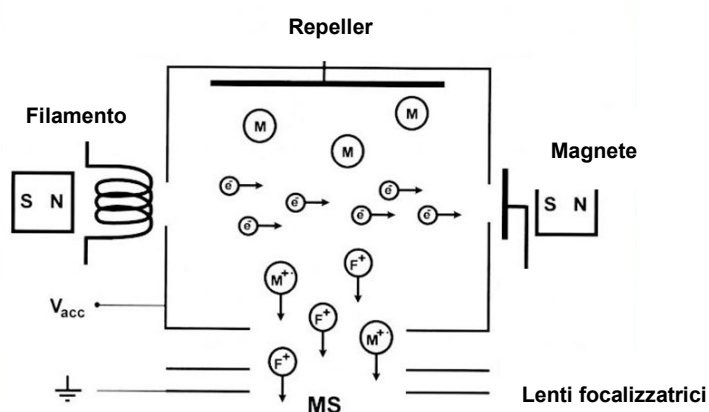


Figura 4.2.1.1 - Schema del funzionamento di una sorgente EI ¹⁹

A questo punto gli ioni vengono trasportati attraverso delle lenti focalizzatrici, di carica opposta agli ioni, poste in serie a potenziali via via maggiori.

4.2.2 Analizzatore

Trasportati dalle lenti focalizzatrici, gli ioni arrivano ad un analizzatore. Gli analizzatori lavorano o su un principio elettrico o su uno magnetico. Nel primo caso, lo ione acquista energia elettrica che viene tramutata in energia cinetica e quindi viene misurata la velocità messa in relazione a m/z . Esempi di analizzatori di questo tipo sono i quadrupoli.

L'analizzatore di massa a quadrupolo è costituito da quattro barre metalliche parallele alle quali vengono applicati due potenziali, uno continuo (DC) e uno variabile (RF). La combinazione di questi due campi elettrici permette la separazione degli ioni che riescono ad attraversare il campo quadrupolare solo se possiedono un determinato m/z .

Il singolo quadrupolo permette di effettuare una scansione sequenziale che seleziona solo gli ioni caratterizzati da uno specifico rapporto massa/carica. Questo tipo di analizzatore può funzionare con diverse modalità.

Con la modalità *full scan* si acquisisce tutto lo spettro della molecola e questo permette di fare un'analisi quantitativa e qualitativa. La modalità a scansione completa compie una scansione sequenziale con il passaggio di ioni con un unico m/z alla volta. Il quadrupolo in questo caso funge da filtro di massa nel tempo e la scansione viene eseguita selezionando tensioni continue e RF sempre maggiori. Questa modalità risulta meno sensibile di altre, in quanto il ciclo di lavoro per ciascun valore di m/z è notevolmente inferiore a 100%; resta comunque una modalità utile poiché mostra tutti gli ioni che si formano all'interno della sorgente inviando al rivelatore ciascun valore di m/z che rientri nell'intervallo di massa selezionato.

La modalità *single ion monitoring* (SIM), invece, consente una migliore analisi quantitativa poiché si monitora uno ione target in maniera quasi continuativa che permette un'acquisizione del 100% durante il ciclo di lavoro. Si può quindi scegliere di seguire lo ione molecolare o lo ione con rapporto segnale/rumore più elevato.

Infine, si possono anche utilizzare le due modalità in modo combinato; prima si acquisisce in *full scan* e poi in SIM si monitorano i composti target.

Nella *Figura 4.2.2.1* viene mostrata la struttura di un analizzatore quadrupolo.

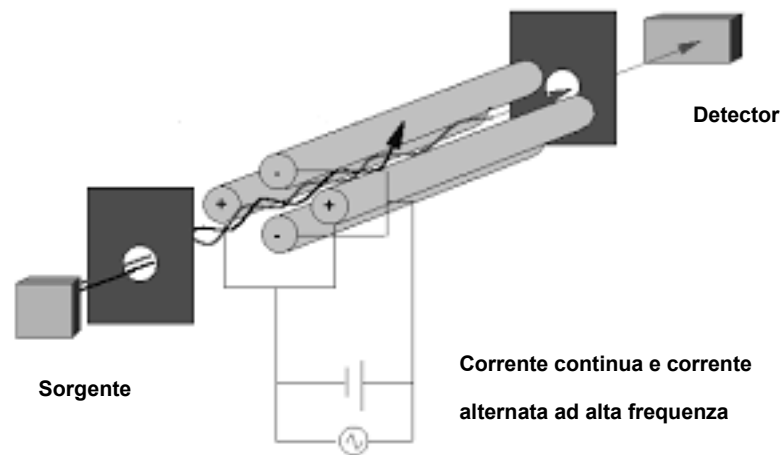


Figura 4.2.2.1 - Analizzatore a quadrupolo ²⁰

Il triplo quadrupolo, il cui schema è rappresentato in *Figura 4.2.2.2*, invece, è costituito da tre quadrupoli dove il secondo funge da cella di collisione (Q1, Q2 e Q3) disposti in serie e consente di ottenere informazioni di diversa natura.

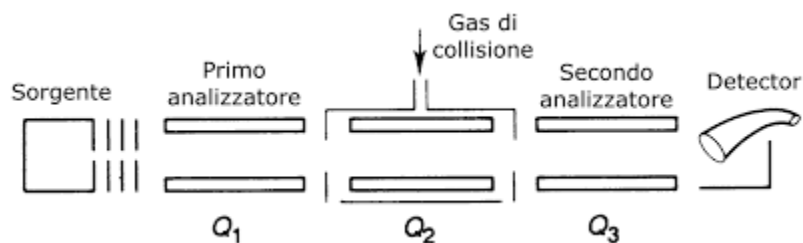


Figura 4.2.2.2 - Schema analizzatore triplo quadrupolo ²¹

Rispetto al singolo quadrupolo, il triplo incrementa la selettività dando una migliore analisi qualitativa permettendo un'analisi MS/MS; infatti, con questo analizzatore si può frammentare una molecola, selezionare un frammento e frammentarlo di nuovo.

Il primo quadrupolo seleziona e isola un frammento che poi viene inviato alla cella di collisione, in cui lo ione precursore viene frammentato nuovamente. Qui è richiesto un gas di collisione, ossia un gas inerte, non reattivo (come l'azoto o l'argon) e le tensioni applicate alla cella di collisione differiscono da quelle applicate agli altri quadrupoli per

umentare il moto di tutti gli ioni prodotto verso il terzo quadrupolo. Gli ioni vengono inviati al terzo quadrupolo che può isolare un nuovo frammento. In questo modo si riescono ad esaminare più precursori.

Anche questo tipo di analizzatore può lavorare in diverse modalità. La modalità più sensibile per questo tipo di analizzatore è definita come *single reaction monitor* (SRM) e prevede di fissare entrambi i quadrupoli per monitorare uno specifico ione precursore e uno specifico ione prodotto. L'esecuzione di più SRM per gli stessi ioni precursore viene definita *multireaction monitor* (MRM). MRM è molto sensibile per la quantificazione ed è caratterizzata dall'impostazione di un singolo valore m/z di Q3 che seleziona quindi un frammento specifico da quelli che arrivano dalla cella di collisione. In alternativa il Q3 può essere impostato in modalità *scan* e in questo modo esegue una scansione sequenziale degli ioni generati nella cella di collisione, facendone passare un unico valore di m/z alla volta.

4.3 STRUMENTAZIONE UTILIZZATA IN QUESTO LAVORO

Lo strumento utilizzato in questa tesi viene mostrato in *Figura 4.3.1* ed è costituito da: un autocampionatore PAL, iniettore PTV, un gascromatografo Trace 1310 Thermo Fisher Scientific interfacciato con uno spettrometro di massa dotato di analizzatore a triplo quadrupolo TSQ9000 Thermo Fisher Scientific.



Figura 4.3.1 - Gascromatografo Trace 1310 con TSQ9000 e Autocampionatore PAL Thermo Fisher Scientific utilizzato in questo lavoro

Per l'analisi cromatografica è stata installata una colonna capillare in silice fusa HP-5MS J&W (5%-fenil)-metilpolisilossano di lunghezza 30 metri, diametro 0.25 mm e spessore 0.25 μm .

Il TSQ9000 della Thermo Fisher Scientific utilizzato per le analisi effettuate in questo lavoro di tesi ha un iniettore PTV a temperatura programmabile che può lavorare in tre differenti modalità operative: *split*, *splitless* e *large volume*. Nella prima modalità il flusso del gas di trasporto si suddivide tra la porta di iniezione, lo *split vent*, e la valvola, che resta aperta per tutto il tempo. Nel caso dello *splitless*, lo *split vent* può rimanere chiuso per trasferire l'intero campione in colonna e, invece, con il *large volume* si possono iniettare grandi quantità eliminando il solvente prima dell'entrata in colonna.

La sorgente è una sorgente a impatto elettronico, *Advanced Electron Ionization (AEI)*. Rispetto a una classica sorgente EI non è presente il repeller e l'energia del fascio prodotto è di 50 eV invece dei convenzionali 70 eV; la mancanza del repeller fa in modo che la sorgente si sporchi in modo meno significativo, mentre grazie alla minore energia degli elettroni non è necessario cambiare le impostazioni della sorgente in base agli analiti di interesse. Sono inoltre presenti due filamenti in linea al corpo sorgente, perpendicolari all'entrata del campione. La posizione del filamento aumenta l'efficienza nella ionizzazione e di conseguenza la sensibilità delle analisi.

In *Figura 4.3.2* viene mostrata la sorgente AEI della Thermo Scientific utilizzata in questo lavoro.

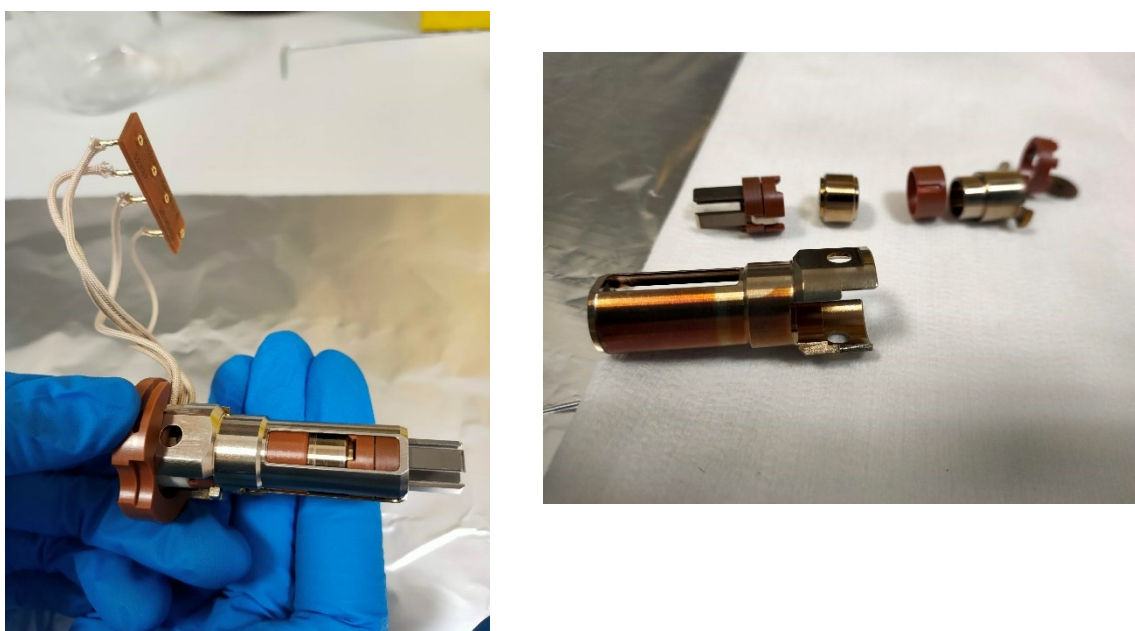


Figura 4.3.2 - Sorgente AEI Thermo Scientific

La sorgente è costituita da diverse parti, tra cui l'*ion volume*, dove avviene la prima ionizzazione del campione, che poi viene focalizzato e spinto nel primo quadrupolo.

Il compito del filamento è quello di generare elettroni; grazie a questo si crea un passaggio di corrente, il filamento si scalda e gli elettroni vengono emessi. A questo punto vanno a bombardare le molecole neutre in uscita dalla colonna e si formeranno in questo modo lo ione molecolare e altri frammenti.

Il fascio di elettroni deve essere opportunamente direzionato ed ha un'energia costante, di 50 eV, che garantisce comunque la possibilità di confronto con la libreria.

Dalla ionizzazione nella sorgente si formano ioni positivi e negativi e frammenti neutri; solo quelli positivi riusciranno a proseguire.

Prima di Q1 si trova un prefiltro ad S utile per impedire il passaggio dei neutri che sporcherebbero il quadrupolo; la forma ad S permette solo agli ioni carichi di passare e questo fornisce un vantaggio pratico in quanto, grazie a questo, il quadrupolo non necessiterà di pulizia.

Il primo e il terzo quadrupolo sono classici quadrupoli a barre; il secondo è una cella di collisione Evocell. Il primo seleziona alcune masse che vanno al Q2, la cella di collisione, in cui viene applicata un'energia di collisione capace di frammentare la massa selezionata, e al Q3 viene presa la massa a intensità più alta.

In alternativa tutti gli ioni possono passare attraverso Q1 e Q2 e arrivare a Q3.

In fondo si trova poi un dinodo dove le masse rimbalzano sull'elettromoltiplicatore. Per ogni frammento che colpisce l'elettromoltiplicatore, viene emesso un fascio di elettroni che moltiplica il segnale. Più saranno i frammenti dello stesso tipo, più sarà intenso il segnale.

Capitolo 5

MATERIALI E METODI

5.1 MATERIALI UTILIZZATI

In questo paragrafo vengono elencati i materiali impiegati in ogni fase del presente metodo analitico.

Nella fase di campionamento sono stati utilizzati:

- bottiglia da 2 L in PE
- *vials* in vetro da 40 ml
- siringa e filtro a 0,45 μm di porosità
- bottiglia sterile in PETG da 500 ml
- bottiglia in HDPE da 200 ml
- bottiglia di vetro da 4 L
- bottiglia in vetro da 2,5L
- campionatore *grab*

Tutti i solventi utilizzati sono specifici per l'analisi di pesticidi, quindi dichiarati esenti da tracce di queste sostanze.

Per la fase pre-analitica (estrazione) sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- Cilindri graduati da 1L e da 50 mL
- Imbuti separatori da 1L
- Micropipetta da 1mL
- Pipette Pasteur
- Diclorometano
- Toluene
- Acetone
- Esano
- Dimetildiclorosilano

- Persolfato di ammonio al 35% (p/v)
- Acqua MilliQ
- Acido solforico concentrato al 96%
- Acido cloridrico concentrato al 37%
- Stufa
- Imbuti da filtrazione
- Lana di quarzo
- Sodio solfato anidro
- Tubi per evaporatore TBV
- Evaporatore a flusso d'azoto TBV
- Concentratore Pierce a flusso d'azoto

Per la preparazione delle soluzioni a concentrazioni note utilizzate per costruire la retta di calibrazione sono stati utilizzati gli standard elencati nella *Tabella 5.1.1*.

Tabella 5.1.1 - Elenco standard utilizzati per la costruzione della retta di calibrazione

Nome Standard	Concentrazione	CAS	Ditta
2,4-DDD	100 ng/ µl	000053-19-0	Crescent Analytics LLC
2,4-DDE	100 ng/ µl	003424-82-6	Ultra Scientific Italia
2,4-DDT	100 ng/ µl	000789-02-6	Ehrenstorfer
2-FLUOROBIFENILE (B)	4 mg/ml	000321-60-8	O2si Smart solutions
4,4'-DDD	2000 µg/ml	000072-54-8	Ultra Scientific Italia
4,4'-DDE	2000 µg/ml	000072-55-9	Ultra Scientific Italia
4,4'-DDT	2000 µg/ml	000050-29-3	Ultra Scientific Italia
ACENAFTENE D10 (A)	2000 ng/ µl	015067-26-2	Ehrenstorfer

ACLONIFEN	100 µg/ml	074070-46-5	Crescent Chemical Company
ALACLORO	100 ng/µl	15972-60-8	Ultra Scientific Italia
ALDRIN	2000 µg/ml	000309-00-2	Ultra Scientific Italia
ALFA-ENDOSULFAN	2000 µg/ml	000959-98-8	Ultra Scientific Italia
ALFA-BHC	2000 µg/ml	000319-84-6	Ultra Scientific Italia
ATRAZINA	100 µg/ml	001912-24-9	Ehrenstorfer
BETA-BHC	2000 µg/ml	000319-85-7	Ultra Scientific Italia
BETA-ENDOSULFAN	2000 µg/ml	033213-65-9	Ultra Scientific Italia
CHINOSSIFEN	10 µg/ml	124495-18-7	Ehrenstorfer
CIS-CLORDANO	2000 µg/ml	005103-71-9	Ultra Scientific Italia
CLORFENVINFOS	100 ng/ µl	000470-90-6	Ehrenstorfer
CLORPIRIFOS	1 mg/ml	002921-88-2	Crescent Chemical Co.
CRISENE D12 (A)	2000 ng/ µl	001719-03-5	Ehrenstorfer
DELTA-BHC	2000 µg/ml	000319-86-8	Ultra Scientific Italia
DEMETON-O	100 µg/ml	000298-03-3	Crescent Analytics LLC
DICLORVOS	10 µg/ml	000062-73-7	A2S
DICOFOL	100 mg/L	000115-32-2	O2si Smart solutions
DIELDRIN	2000 µg/ml	000060-57-1	Ultra Scientific Italia
DIMETOATO	100 µg/ml	000060-51-5	Ultra Scientific Italia

ENDOSULFAN SOLFATO	2000 µg/ml	001031-07-8	Ultra Scientific Italia
ENDRIN	2000 µg/ml	000072-20-8	Ultra Scientific Italia
ENDRIN ALDEIDE	2000 µg/ml	007421-93-4	Ultra Scientific Italia
ENDRIN CHETONE	2000 µg/ml	053494-70-5	Ultra Scientific Italia
FENANTRENE D10 (A)	2000 ng/ µl	001517-22-2	Ehrenstorfer
FENITROTION	100 ng/ µl	000122-14-5	Ehrenstorfer
FENTION	10 ng/ µl	000055-38-9	Ehrenstorfer
GAMMA-BHC	2000 µg/ml	000058-89-9	Ultra Scientific Italia
ISODRIN	100 µg/ml	000465-73-6	Ultra Scientific Italia
ISOPROTURON	100 µg/ml	034123-59-6	Crescent Analytics LLC
MALATION	1000 µg/ml	000121-75-5	Crescent Analytics LLC
MEVINFOS	1 mg/ml	007786-34-7	Crescent Analytics LLC
PARATION ETILE	100 ng/ µl	000056-38-2	Ehrenstorfer
PARATION METILE	1000 µg/ml	000298-00-0	Crescent Analytics LLC
p-TERFENILE D14 (B)	4 mg/ml	001718-51-0	O2si Smart solutions
SIMAZINA	100 µg/ml	000122-34-9	Ehrenstorfer
TERBUTILAZINA	100 µg/ml	005915-41-3	Ultra Scientific Italia
TERBUTRINA	100 ng/ µl	000886-50-0	Ehrenstorfer
TRANS-CLORDANO	2000 µg/ml	005103-74-2	Ultra Scientific Italia
TRIFLURALIN	100 µg/ml	001582-09-8	Ultra Scientific Italia

PERILENE d12 (A)	2000 ng/ μ l	001520-96-3	Ehrenstorfer
-------------------------	------------------	-------------	--------------

Gli standard di iniezione deuterati (SID), indicati con **(A)** nella tabella soprastante, vengono aggiunti a concentrazione nota, prima dell'iniezione, in tutti i campioni. L'area di questi composti a concentrazione nota viene presa come riferimento per il calcolo delle concentrazioni degli analiti target.

I composti marcati (SURR), indicati nella tabella con **(B)** vengono inseriti a concentrazione nota in fase estrattiva per valutare la validità del metodo analitico, il loro recupero % dovrà essere all'interno del range consentito dal metodo, 40-120%.

5.2 METODI DI RIFERIMENTO

Il metodo ufficiale per l'analisi dei pesticidi prevede una fase di estrazione seguita dall'analisi diretta in GC/MS. Solo nel caso di contaminazioni causate da interferenti si rende necessaria una purificazione tramite cromatografia a permeazione di gel (GPC).

Prima di procedere alla descrizione del metodo di estrazione, è necessario definire il limite di quantificazione (LOQ) e il limite di rilevabilità strumentale (LOD). Il LOQ è definito come il limite sopra il quale si può eseguire un'analisi quantitativa; è utile per definire il limite inferiore dell'intervallo di misurazione. I campioni che non presentano un valore di concentrazione pari o superiore a quello del LOQ non possono considerarsi quantificabili. Solitamente viene calcolato moltiplicando per 10 la deviazione standard relativa alla misura effettuata per il bianco, in questo modo si ottiene un livello di confidenza del 99% e un'incertezza di $\pm 30\%$ nella misura del valore del limite di quantificazione. Il Laboratorio CSMO del Provveditorato Interregionale OO.PP., essendo un Ente di controllo, deve raggiungere almeno il 30% dei limiti di legge vigenti (nazionale, regionale o relativi a "leggi speciali") o agli standard di qualità nel caso di regolamenti o normative Europee (SQA, SQMA, ecc.). In questo lavoro di tesi, quando possibile LOQ sarà anche inferiore a un terzo del valore di SQA.

LOD è calcolato moltiplicando per tre la deviazione standard relativa a 10 iniezioni del bianco.

Dalla letteratura si vede come siano abbastanza comuni le ricerche di tracce di pesticidi in matrici acqua, sedimento e biota, ma come siano più rari, invece, i dati relativi a queste analisi condotte su matrici acqua salata.

Il metodo sviluppato nel presente lavoro di tesi verrà utilizzato per analisi di routine ed è quindi necessario seguire le norme e le linee guida dei metodi ufficiali utilizzati nel laboratorio quali EPA 3510, EPA 8270 e IRSA 5060.

Nei paragrafi successivi verranno descritte le procedure con le quali vengono condotte le fasi di pre-analitica, di iniezione e di analisi con alcuni confronti per la parte estrattiva e strumentale con studi trovati in letteratura.

5.3 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

La procedura pre-analitica per l'analisi dei pesticidi si svolge in diverse fasi; dalla raccolta del campione alla sua preparazione in funzione della tecnica analitica che si intende utilizzare. Questo rende il processo complesso e delicato in quanto ogni errore commesso può provocare una perdita degli analiti o una contaminazione, compromettendo il risultato finale.

La scelta della metodologia pre-analitica da seguire dipende, quindi, da diversi fattori. Si devono prima di tutto tenere in considerazione:

- La natura della matrice in cui si trovano gli analiti di interesse
- la struttura e la forma chimica degli analiti
- i livelli di concentrazione attesi
- la tipologia di analisi da effettuare

Lo sviluppo delle varie tecniche utilizzate nel campo della chimica analitica si è posto come obiettivi la riduzione o l'eliminazione dei solventi organici, l'automatizzazione dei processi e l'incremento di analiti target da poter determinare in una sola corsa analitica.²²

Le proprietà chimico fisiche dei pesticidi possono differire notevolmente; alcuni sono acidi, altri delle basi, alcuni contengono alogeni, altri fosfori, zolfo o azoto. Inoltre, certi composti risultano molto volatili e altri meno o non evaporano affatto. Tutte queste diversità rendono difficile lo sviluppo di un metodo pre-analitico che possa risultare "universale" e che permetta di fare analisi multiresiduali.

5.3.1 Campionamento

I campioni d'acqua sono stati prelevati in 17 punti all'interno dei rii di Venezia, i quali vengono esplicitati e illustrati nella *Tabella 5.3.1.1* e nella *Figura 5.3.1.1* sottostanti.

Tabella 5.3.1.1 - *Elenco delle stazioni in cui sono stati prelevati i campioni d'acqua salata analizzati*

Stazione	Località
1	Rio San Piero (di fronte cantiere ACTV)
8	Rio dei Mendicanti (campo San Giovanni e Paolo)
14	Rio dei Riformati (fronte porta del convento Suore di Clausura)
15	Rio di Cannaregio (sottoportico San Giovanni)
18	Rio Ca' Tron
19	Rio di San Polo (corte Amaltea)
22	Rio dei Carmini (Pali Vesta)
28	Rio dell'Arsenale (altezza porta ingresso Arsenale)
29	Canal Grande (Campo San Simeon grande)
30	Canal Grande (Rialto stazione A)
31	Canal Grande (Salute pontile ACTV)
32	Rio di San Gerardo (Saccafisola di fronte la chiesa)
34	Rio del Curame (Giudecca)
35	Rio Croce (Giudecca, prima della chiesa del Redentore)
36	Marittima
37	Rio di S. Elena (Stadio)
38	Tronchetto (ormeggio mezzi scalo fluviale)

I campioni raccolti sono stati destinati ad analisi microbiologiche, di microinquinanti organici, di metalli pesanti, di TOC (*total organic carbon*) e VOC (*volatile organic carbon*). Qui di seguito vengono elencati tutti i campioni prelevati, sebbene non tutti siano stati utilizzati per lo scopo prefissato per questa tesi.



Figura 5.3.1.1 - Mappa delle stazioni di campionamento all'interno dei rii di Venezia

Per ogni punto sono stati quindi prelevati:

- una bottiglia da 2 L in PE per i macrodescrittori come solidi sospesi, nutrienti e conducibilità
- una *vial* in vetro da 40 ml per la determinazione del TOC
- una *vial* in vetro da 40 ml per la determinazione del DOC (*dissolved organic carbon*), il campione viene filtrato in campo con siringa e filtro a 0,45 micron di porosità
- due *vials* in vetro da 40 ml acidificate con HCl per la determinazione dei VOC
- una bottiglia sterile in PETG (polietilene tereftalato modificato con glicole) da 500 ml per la determinazione dell'*Escherichia coli*
- una bottiglia in HDPE (*high density polyethylene*) da 200 ml per la determinazione dei metalli in tracce (il campione viene prelevato con la tecnica di campionamento mani sporche/mani pulite e inserito in un doppio sacchetto)

- una bottiglia di vetro da 4 L silanizzata per il campionamento dei microinquinanti organici
- una bottiglia in vetro da 2,5L acidificata
- una bottiglia in vetro da 2,5L nitrificata per la determinazione degli organotin

Per l'analisi dei pesticidi è stata analizzata l'acqua prelevata con la bottiglia di vetro da 2,5L acidificata.

La *Figura 5.3.1.2* mostra alcuni strumenti utilizzati per il prelievo dei campioni.

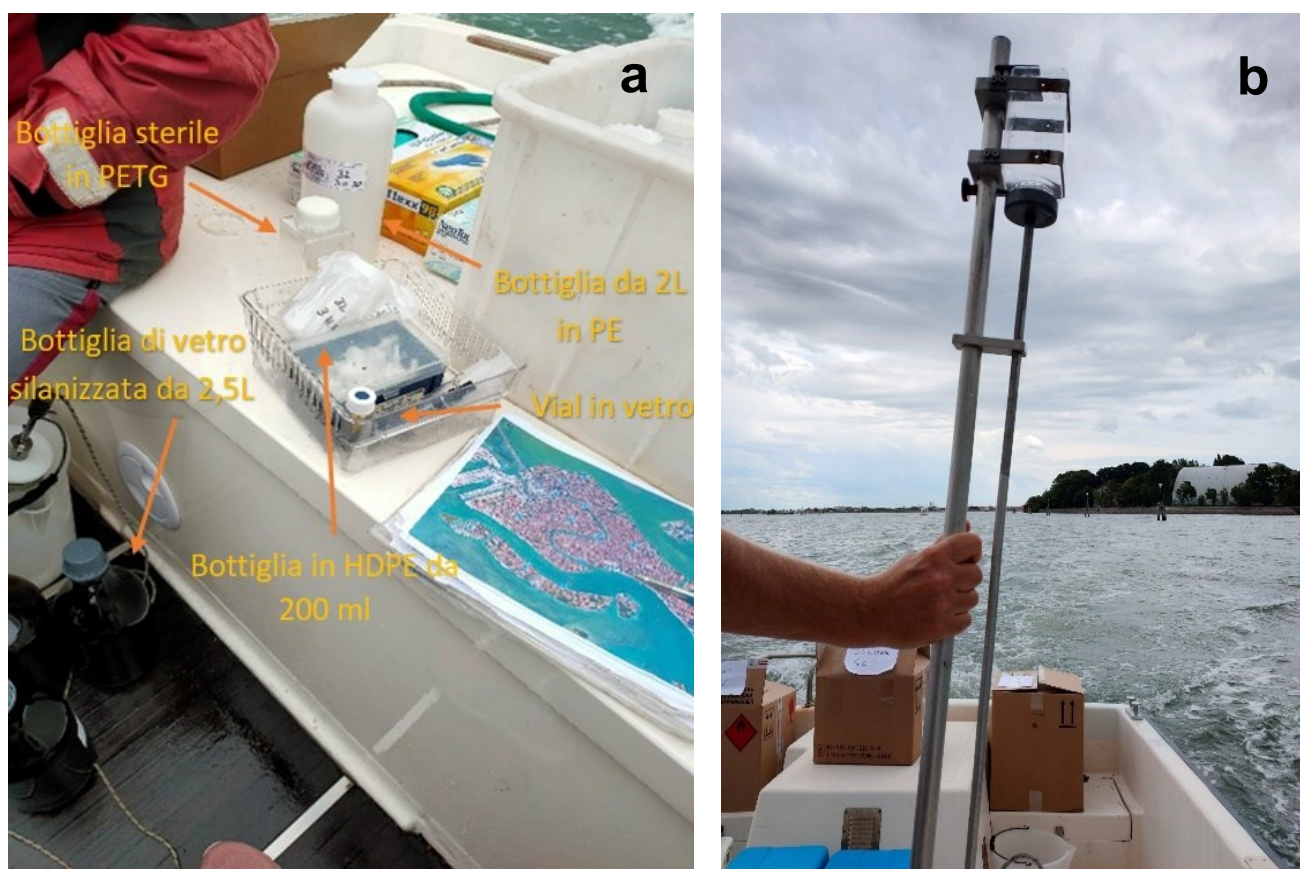


Figura 5.3.1.2 – a) Foto della strumentazione utilizzata per i campionamenti. b) Campionatore "grab" per la raccolta dei campioni destinate alle analisi microbiologiche

5.3.2 Preparazione Vetreria

Prima di estrarre il campione, si deve preparare la vetreria. Per lo studio presentato in questa tesi è sufficiente lavare la vetreria con acqua e sapone ma periodicamente questa viene anche trattata attraverso una procedura che prevede un'acidificazione iniziale e una successiva deattivazione.

Lo scopo dell'acidificazione è pulire la vetreria, che verrà utilizzata per l'estrazione dei campioni, da eventuali residui di inquinanti rimasti da analisi precedenti.

La deattivazione, invece, è un trattamento che è utile per rendere inerti i siti attivi del vetro impedendo fenomeni di adsorbimento.

Per la prima lavorazione si parte da una soluzione di persolfato di ammonio al 35% (p/v) in acido solforico concentrato. Si sciolgono, in una bottiglia di vetro, 350 grammi di persolfato di ammonio e si aggiunge poi acido solforico fino ad arrivare ad un volume di 1 litro. Si procede ad agitare per sciogliere tutto il sale presente. Preparata la soluzione, prima di essere utilizzata, questa deve riposare per almeno mezza giornata con il tappo leggermente svitato per consentire lo sfiato dei vapori. Con il reagente ottenuto si bagnano tutte le pareti interne degli strumenti che poi dovranno essere usati nella fase estrattiva. A questo punto si sciacqua abbondantemente con acqua corrente e successivamente con acqua MilliQ. Si asciuga esternamente e internamente si sciacqua con acetone. Se necessario si pone la vetreria in stufa a 100°C per eliminare tutti i residui di acetone.

Successivamente si procede con la deattivazione attraverso la silanizzazione del vetro. La soluzione deattivante (silanizzante) si prepara diluendo 10 ml di dimetildiclorosilano in 200 ml di toluene; si bagnano nuovamente le pareti della vetreria con il reattivo ottenuto per impedire fenomeni di adsorbimento degli analiti di interesse. La reazione è istantanea e non è quindi necessario un contatto prolungato con le pareti del materiale. Con questa procedura, si crea una situazione di bagnabilità non favorevole e il liquido, non avendo grande affinità chimica con l'interfaccia solida, forma delle gocce con elevato angolo di contatto che chiudono i pori del vetro, rendendoli inattivi. In questo modo si assicurano recuperi migliori nell'analisi finale. Anche in questo caso si sciacqua con acqua corrente e acqua MilliQ. Infine, la vetreria viene posta in stufa a 100 °C per un'ora e poi a 230°C per altre due ore.

5.4 ESTRAZIONE

Subito dopo la fase di campionamento, in molte metodologie, viene effettuata l'estrazione, un passaggio fondamentale quanto critico. Generalmente più questo step risulta semplice, poco elaborato e automatizzato, più si riduce il tempo necessario a portarlo a termine, si minimizzano le manipolazioni del campione e quindi la possibilità di introdurre errori (contaminanti o perdita degli analiti).

In letteratura sono presenti numerosi esempi di tecniche di estrazione, sperimentate proprio con lo scopo di trovare quella che potesse essere la migliore considerando sensibilità, precisione, selettività, semplicità, velocità, costi e uso di solventi.²³

In questo capitolo viene descritta inizialmente la tecnica di estrazione utilizzata per l'analisi multiresiduale di pesticidi per questo studio; in seguito, vengono riportate le principali tecniche di estrazione presenti in letteratura per la determinazione dei pesticidi e successivamente confrontati tra loro e con la procedura da noi identificata e utilizzata;

In questo capitolo, dopo una descrizione dettagliata della tecnica estrattiva utilizzata, si procede ad un confronto prendendo in considerazione le principali tecniche di estrazione presenti in letteratura per la determinazione dei pesticidi e quella utilizzata in questo lavoro, al fine di definirne la tecnica più idonea per poter analizzare più classi di pesticidi utilizzando un'unica estrazione.

5.4.1 Estrazione liquido-liquido utilizzata in questo lavoro

In questo lavoro di tesi, per la determinazione dei prodotti fitosanitari nelle acque di laguna, viene utilizzata la procedura di estrazione liquido/liquido seguendo le linee guida del metodo EPA 3510C 1996.

Si misura, inizialmente, con un cilindro graduato di classe A, 1 litro di campione che poi viene versato in un imbuto separatore di vetro. Risulta necessario procedere, poi, con due estrazioni: una in ambiente neutro e uno in ambiente acido per avere la certezza di recuperare tutti gli analiti desiderati.

Si aggiunge quindi 1 ml di standard di recupero a 40 ng. Lo standard di recupero è composto da una miscela di sostanze marcate in grado di coprire tutta la corsa cromatografica di interesse, in modo da fornire dei punti di riferimento e di paragone per il riconoscimento e la quantificazione degli analiti nei campioni reali.

A questo punto si aggiunge una prima aliquota da 50 mL di diclorometano. Si agita per due minuti sfiatando i vapori del solvente, si lascia decantare successivamente le fasi e si separa l'estratto organico. Quest'ultimo passa attraverso un filtro, costituito da lana di quarzo coperta con sodio solfato anidro purificato, posto in un imbuto da filtrazione; questo serve per trattenere eventuali tracce di acqua rimaste. Il filtro viene preventivamente bagnato con diclorometano per eliminare eventuali impurità presenti nel sodio solfato e per garantire una maggior dispersione al passaggio del solvente arricchito degli analiti target; infatti, con il filtro a secco, si formerebbero dei percorsi preferenziali e l'eventuale presenza di acqua andrebbe ad occluderlo.

Dopo la prima separazione si procede con lo stesso procedimento per altre due volte e dopo ogni separazione si recupera la frazione organica in tubo e si lava il filtro con diclorometano, raccogliendo anche quest'ultimo lavaggio nel tubo.

Quando tutto l'estratto è trasferito in un tubo per evaporatore, si lava nuovamente il filtro e si passa a concentrare l'estratto in un evaporatore con bagno termostato e sotto flusso di azoto controllato (Turbovap II), a 30°C fino ad arrivare ad un volume di 0,5 ml.

A questo punto si procede con la seconda estrazione, questa volta in ambiente acido. Si aggiunge quindi al campione qualche ml di acido cloridrico con una pipetta Pasteur e si controlla il pH per verificare l'acidità (deve essere intorno a 4). Si ripete quindi la procedura di estrazione descritta sopra.

Alla fine della fase estrattiva il campione viene trasferito in un inserto deattivato (silanizzato) e portato ad un volume finale di 100 µl con l'ausilio di un concentratore con piastra termostata e a flusso d'azoto.

La linearità viene valutata utilizzando standard di calibrazione preparati a concentrazioni comprese in un range tra 0.2 pg/ul e 40 pg/ul; tutti gli analiti presentano linearità in questo intervallo. Tra gli analiti presi in considerazione, il valore di RSD% maggiore lo si trova per isoproturon con 8.326%, R^2 è invece pari a 0.9969. Tutti gli altri presentano un RSD% che va da 1.303% per il Beta-endosulfan al 8.079% per il diclorvos. LOD è 0.00002 µg/L, mentre LOQ arriva fino a 0.00004 µg/L.

Per il calcolo dei recuperi si utilizzano, invece, degli standard con caratteristiche chimico-fisiche simili a quelle dei composti target (in alternativa si potrebbero usare degli standard degli stessi analiti ricercati, marcati). Questi standard vengono aggiunti prima che il processo di estrazione venga eseguito, in questo modo seguono la stessa procedura a cui vengono sottoposti composti eventualmente presenti nei campioni.

Il laboratorio dove è stato sviluppato questo lavoro di tesi è un organo di controllo; non prevede sistemi automatizzati per la fase pre-analitica ma preferisce far seguire il processo di estrazione direttamente da un operatore.

Il metodo presentato ha come obiettivo l'analisi e la determinazione di un numero molto elevato di analiti, che appartengono a classi diverse di composti. Si tende quindi a cercare un metodo che sia valido, preciso ed efficace per tutte le famiglie di pesticidi, pur essendo possibile che per alcune di esse, altre tecniche portino a risultati migliori.

5.4.2 Tecniche di estrazione utilizzate per analisi GC-MS per la determinazione dei pesticidi in matrice

Una delle tecniche estrattive più utilizzate e più antiche, è l'estrazione liquido-liquido, dall'inglese *liquid-liquid extraction*, (LLE). Solitamente si usa come solvente il diclorometano oppure miscele di quest'ultimo con etere di petrolio o esano. LLE è un metodo economico e semplice ma richiede l'utilizzo di grandi quantità di solventi, cosa che costituisce un problema nel momento in cui i residui di scarto classificati come rifiuti pericolosi devono essere smaltiti. Per sopperire agli svantaggi di questo processo, sono state sperimentate negli anni diverse modifiche; la prima tra queste è la miniaturizzazione del processo.

Si può citare, quindi, la microestrazione liquido-liquido (MLLE), che è essenzialmente una procedura in cui avviene sia un'estrazione che una pre-concentrazione e non richiede ulteriori fasi di purificazione e pulizia. Gli analiti, infatti, passano da un grande volume di campione a un piccolo volume di solvente e, grazie a questo, è possibile ottenere anche elevati fattori di arricchimento evitando contaminazioni dovute a un largo uso di solventi o a materiali di estrazione (se questa avviene in fase solida).²³

Gutierrez et al. (1998) hanno utilizzato questo tipo di estrazione per determinare la concentrazione di alcuni pesticidi in acqua, tra cui alcuni pesticidi clorurati come α - e β -endosulfan ed endosulfan solfato. Nella loro procedura si aggiungono tutti gli analiti di interesse in un range di concentrazioni tra 1 e 9 ng/mL in 500 mL di acqua; viene poi tutto inserito in un imbuto separatore e, infine, avviene l'aggiunta di 0.5 mL di uno standard interno in cui è presente antracene-d10 in esano a una concentrazione di 3 μ g/mL. La miscela viene agitata per 2 minuti, al termine dei quali la fase organica viene recuperata sfruttando il collegamento dell'imbuto separatore con un recipiente con acqua deionizzata; quest'ultima, che arriva dal basso, fa aumentare il livello del liquido all'interno dell'imbuto, finché la fase estratta arriva al limite superiore e viene

recuperata tramite una pipetta Pasteur. L'apparecchiatura usata viene mostrata in *Figura 5.4.2.1*.

Per ottimizzare il metodo, vengono considerati diversi solventi, tra cui il migliore si è dimostrato essere l'esano poiché è poco solubile in acqua mentre tutti gli analiti sono ben solubili in esano, si ottiene così una migliore resa di estrazione.

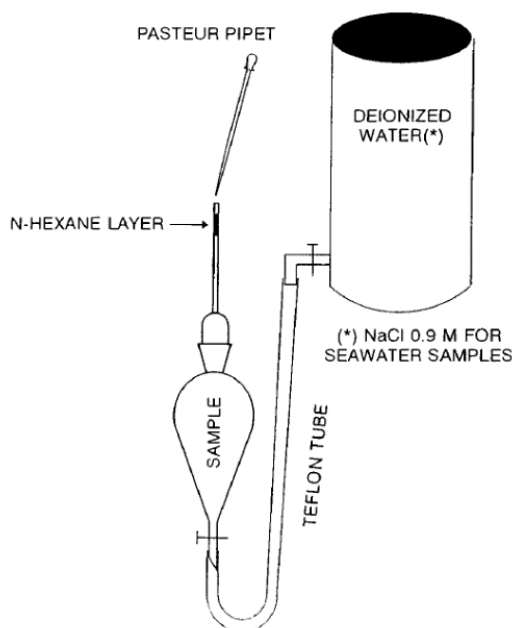


Figura 5.4.2.1 – Apparecchiatura usata per MLLC ²⁴

Per la curva di calibrazione vengono preparati diversi standard partendo da campioni di acqua con concentrazioni di 1,3,5,7 e 9 ng/mL di ogni pesticida. Ogni campione viene estratto seguendo la procedura descritta. Tutti i pesticidi considerati mostrano una buona linearità nel range di concentrazioni scelto, fornendo valori di R^2 tra 0.9946 a 0.9993. I recuperi e la riproducibilità vengono testati a due livelli di concentrazione, aggiungendo all'acqua quantità note di pesticidi; 1 e 5 ng/mL di ogni composto a 500 mL di acqua in 10 campioni diversi. In seguito, si calcolano i recuperi %, la deviazione standard corrispondente per ogni analita, il limite di rilevabilità e il limite di quantificazione.

Alla concentrazione di 1 ng/mL i recuperi variano tra 94 e 125.2%, mentre a 5 ng/mL variano tra 95.1 e 106.8%. LOD va da 3 a 35 pg/mL mentre LOQ da 10 a 116 pg/mL.²⁴

Altri studi utilizzano la microestrazione liquido-liquido dispersiva (DLLME) in cui si aggiunge al campione acquoso da estrarre, un solvente disperdente, spesso acetone o metanolo, e un solvente di estrazione come tetraclorometano (CCl_4). Si produce una

soluzione torbida che viene poi centrifugata da cui si ottiene una separazione di fasi: in questo modo si preleva facilmente la parte di interesse. Un ulteriore sviluppo di questa tecnica è la microestrazione liquido-liquido assistita da vortice (VALLME).²³

La tecnica DLLME è stata utilizzata da Tankiewicz et al. (2017) per un'analisi multiresiduale di 34 pesticidi in campioni di acqua da varie matrici (fiume, lago, mare...) raccolti in differenti periodi dell'anno dopo l'applicazione di trattamenti agro-chimici. 10 mL di acqua vengono inseriti in un contenitore di vetro a cui vengono aggiunti tutti i pesticidi di interesse a una concentrazione di 1 mg/L e uno standard interno a 10 µg/L. Una miscela di 1 mL di metanolo, usato come solvente disperdente, e 40 µL di tetracloroetilene, come solvente di estrazione, viene aggiunta al campione con una siringa da 5 mL; viene agitato tutto per 30 secondi. Si forma un'emulsione torbida composta di acqua, metanolo e tetracloroetilene e, mediante centrifugazione a 2500 rpm per 3 minuti, si formano delle gocce disperse della fase di estratto che poi si stabiliscono sul fondo; 30 µL di fase estrattiva vengono prelevati con una microsiringa per essere trasferiti in una *vial* per l'iniezione.

Nell'uso di questa tecnica la scelta del solvente da utilizzare è fondamentale: infatti, un solvente di estrazione adatto dovrebbe avere affinità per i pesticidi e una densità maggiore dell'acqua, risultando compatibile con il sistema cromatografico. Inoltre, quando si sceglie il solvente disperdente, si deve tenere anche in considerazione la sua capacità di miscelarsi con quello di estrazione e con la fase acquosa, oltre all'abilità di diminuire la tensione interfacciale per ridurre la dimensione delle gocce, aumentando così l'efficienza dell'estrazione. Il risultato migliore si ottiene con una miscela di metanolo e tetracloroetilene.

Oltre alla tipologia dei solventi da utilizzare, anche la scelta del loro volume risulta di notevole importanza per avere una quantità sufficiente per l'analisi in GC e per ottenere un fattore di arricchimento elevato. Il volume di fase disperdente influenza la torbidità dell'emulsione, che influenza il grado di dispersione dell'estratto nella fase acquosa, e, di conseguenza, la quantità della fase sedimentata: 40 µL di tetracloroetilene e 1 mL di metanolo portano a un'estrazione ottimale.

Per quanto riguarda il tempo di estrazione, più questo è lungo, meno è efficace l'isolamento dei diversi analiti: 30 secondi di agitazione forniscono il risultato più efficiente e ripetibile. Infine, temperatura ambiente e un pH costante attorno a 6 completano i parametri ottimizzati per la metodologia riportata.

Per la validazione del metodo, partendo dalla calibrazione, si preparano campioni di acqua a concentrazioni da 0.02 µg/L a 100 µg/L con uno standard interno a 10 µg/L e si ottengono R^2 da 0.9932 a 0.9995. LOD risultante è nel range tra 0.0032 µg/L e 0.017 µg/L. Per il calcolo dei recuperi vengono usati dei campioni arricchiti con gli analiti a due concentrazioni: 1 µg/L e 50 µg/L. Nel primo caso si raggiungono recuperi in un range tra 84-108% mentre nel secondo caso tra 86-115%.²⁵

Uno studio del 2010, invece, mostra come si possa utilizzare anche la VALLME per l'analisi di pesticidi clorurati con GC-MS. Questa estrazione avviene mediante dispersione di un solvente organico in una soluzione acquosa attraverso la miscelazione con vortex, utilizzando un approccio miniaturizzato con micro-volumi di solvente; si usa bromoformio che assicura recuperi migliori con questa tecnica. Vengono aggiunti in 5 mL di campione acquoso tutti gli analiti a concentrazione nota di 1 µg/L, il tutto viene poi messo in un tubo da centrifugazione e vengono aggiunti 100 µL di solvente. La miscela risultante viene agitata per 2 minuti a 3000 rpm con agitatore vortex, in questo modo si formano delle piccole gocce di bromoformio all'interno del bulk acquoso che favoriscono il trasferimento di massa dei pesticidi dalla fase acquosa a quella organica. Successivamente, la soluzione viene centrifugata a 4000 rpm per 5 minuti per separare le due fasi presenti; alla fine, la fase estratta viene prelevata dal fondo con l'ausilio di una siringa da 100 µL.

Anche in questo caso, i passaggi fondamentali per la messa a punto della tecnica pre analitica più efficiente sono: la scelta del solvente e del volume più adatto da usare, la selezione della velocità di rotazione del Vortex e la forza ionica. Il solvente, per essere adatto a questa metodologia, deve essere immiscibile in acqua e deve rimanere sul fondo del tubo di estrazione o sulla superficie della provetta da centrifuga; inoltre, deve avere buona affinità con gli analiti target e un eccellente comportamento cromatografico.

LOD e LOQ riportati sono rispettivamente in un range tra 0.011-0.052 µg/L e tra 0.037-0.173 µg/L. La curva di calibrazione si costruisce usando 8 soluzioni standard dei pesticidi organoclorurati in un range di concentrazioni tra 0.001 e 10 ng/µl e si ottiene un R^2 minimo di 0.996 fino a 0.999. Per il calcolo dei recuperi, si utilizzano campioni di acqua distillata con gli analiti presenti a tre diverse concentrazioni: 0.1, 1 e 5 µg/L. Risultano, in ordine, in un range tra 76-102%, 78-106% e 78-104%. Anche nei campioni reali di acqua sono stati aggiunti tutti i pesticidi a una concentrazione nota di 1 µg/L e i recuperi risultano tra il 71 e 104%.²⁶

In letteratura sono presenti anche studi relativi alla microestrazione in fase liquida basata sulla solidificazione di una goccia di solvente organico galleggiante (LPME-SFO). Si utilizza una quantità minima di solvente, di solito 1-undecanolo, che, con l'aiuto di una siringa viene posto sulla superficie di un campione acquoso. Il solvente usato deve essere immiscibile in acqua, stabile durante l'estrazione, non volatile e con un punto di fusione a una temperatura tra i 10°C e i 30 °C. L'estrazione avviene a bagnomaria e con agitazione, in modo che si formino delle goccioline di solvente sulla superficie acquosa. La *vial* contenente il campione viene poi raffreddata con un bagno a ghiaccio in modo che il solvente solidifichi. A questo punto, il solido viene trasferito in un'altra *vial* e ridisciolto.²³

Chen et al. (2005) hanno riportato l'analisi di quattro pesticidi organofosfati (ethoprop, diazinon, fenthion), utilizzando una microestrazione in fase liquida accoppiata con gascromatografia-spettrometria di massa. Questa tecnica estrattiva è economica, veloce e facilmente automatizzabile; nell'articolo sopra citato, viene descritto l'apparato usato per la LPME, mostrato in Figura 2. Una membrana in fibra cava di polipropilene, con porosità di 0.2 µm e 200 µm di spessore della parete, viene posta in modo da circondare l'ago della siringa usata per l'iniezione nel gascromatografo. Il polipropilene è compatibile con un'ampia gamma di solventi organici e immobilizza fortemente il solvente, fattore molto importante per assicurare che non ci siano perdite durante l'estrazione. La siringa utilizzata è da 10 µl; la fibra viene pulita con ultrasuoni in acetone per 5 minuti e viene tagliata a una lunghezza di 1.5 cm prima dell'introduzione dell'ago; per ogni estrazione viene utilizzata una fibra diversa.

Viene inserito un agitatore di 1 cm x 0.3 cm in 20 ml di campione; 3,5 µl di cicloesano vengono caricati nella siringa e, successivamente, 5 µl di acqua deionizzata. A questo punto viene inserito l'ago all'interno della fibra e viene immerso il tutto nel solvente organico scelto per 15 secondi per impregnare tutti i pori della fibra. Viene iniettata acqua per rimuovere il solvente in eccesso e vengono così ritenuti 3 µl di cicloesano all'interno della fibra. Questa viene ora rimossa e immersa in una *vial* contenente 20 ml di campione acquoso. La siringa viene inserita, quindi, in una siringa a pompa che inizia con una certa velocità a spingere i 3 µl di solvente nella cavità della fibra. Il campione viene centrifugato a 25 °C; dopo un tempo stabilito, 2 µl di cicloesano arricchiti di analiti vengono iniettati in GC-MS.

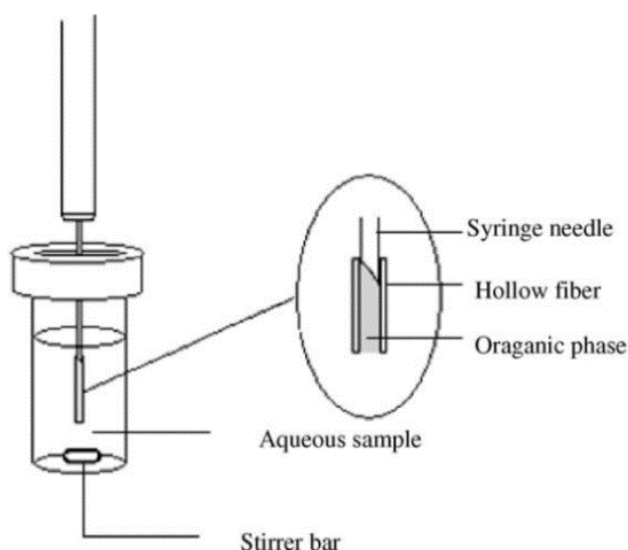


Figura 5.4.2.2 – *Apparecchiatura usata per LPME* ²⁷

Vengono a questo punto ottimizzati diversi parametri. Per la scelta del miglior solvente si devono considerare le caratteristiche fondamentali che questo deve avere nella tecnica utilizzata; quindi, l'immiscibilità in acqua, la giusta polarità in relazione alla fibra utilizzata e la stabilità durante l'estrazione. I più adatti sono l'isooctano e il cicloesano.

Il tempo di estrazione è un altro parametro da ottimizzare. La velocità di agitazione viene invece ottimizzata in quanto un vigoroso mescolamento produce continuamente una nuova interfaccia tra le fasi acquosa e organica, aumentando l'efficienza; 50 minuti di agitazione a 700 rpm con 20 ml di un campione concentrato a 10 ug/L, portano a un'estrazione con maggiore sensibilità.

Un ulteriore test si esegue aggiungendo un sale, il cloruro di sodio, a diverse concentrazioni: 0%, 5%, 10%, 15%, 25% (w/v). Si deve tenere in considerazione, in questo caso, che le molecole polari possono interagire elettrostaticamente con gli ioni che si formano dal sale in soluzione, riducendo la capacità degli stessi di muoversi nella fase organica. La resa massima viene raggiunta a una concentrazione del 15% w/v, utilizzata per lo studio degli altri parametri.

L'aggiunta di acido umico e di metanolo mostra, invece, una diminuzione dell'efficienza nella fase estrattiva.

La validazione di questo metodo fornisce un R^2 minimo di 0.996, quindi tutti gli analiti mostrano una buona linearità; ethoprop in un range di concentrazione tra 0.5 e 100

ug/L, diazinon e disulfoton tra 0.1-50 µg/L, fenthion tra 0.5-50 µg/L. Il LOD è inferiore a 0.042 µg/L per tutti gli analiti tranne che per ethoprop per cui è a 0.200 µg/L.

I campioni analizzati sono di acqua di lago; non erano presenti tracce dei composti ricercati, quindi sono stati aggiunti tutti i composti a 10 µg/L per poter verificare i recuperi che si ottengono con l'utilizzo di questo metodo. Gli RSD% variano tra 5-8%, mentre i recuperi vanno da 83.1 a 107%.²⁷

In uno studio del 2002, l'estrazione liquido-liquido viene fatta *in-vial*, quindi miniaturizzata. In seguito, viene centrifugata per separare le fasi e iniettare successivamente in large volume. Il metodo di analisi è la gascromatografia che permette il raggiungimento di bassi limiti di rilevabilità e l'uso minimo di solvente organico per l'estrazione. La fase critica è sempre quella di estrazione poiché è difficile interfacciarla direttamente al sistema cromatografico. Gli analiti target di questo lavoro sono alcuni pesticidi triazinici, tra cui atrazina, simazina e terbutrina.

La tecnica dell'estrazione liquido-liquido assistita da membrana si basa su una LLE su piccola scala, con una membrana a bassa densità di polietilene, che separa il campione acquoso dalla fase organica. Il tutto viene eseguito all'interno di una *vial* con il successivo trasferimento dell'estratto organico in un'altra *vial* per poi iniettare in large volume. In questo lavoro del 2002 è stata modificata quest'ultima tecnica per poter adattare la membrana a una *vial* convenzionale da 20 ml per lo spazio di testa. Per questo motivo la membrana è costituita da un tubo termosaldato di 6 mm preparato da un piatto non poroso di polipropilene di spessore 0.05 mm. Questa sacca membranosa che si ottiene viene attaccata a un imbuto di acciaio inossidabile e questo dispositivo si inserisce poi in una *vial* con 15 ml di campione. La membrana viene riempita con 500 µl di solvente, viene posta sotto agitazione e infine iniettata in large volume prendendo l'estratto direttamente dalla sacca membranosa. Il dispositivo creato viene mostrato in *Figura 5.4.2.3*.

Per condizionare le membrane vengono estratte 3 volte con 50 ml di esano a temperatura ambiente e, successivamente le *vial* vengono riempite con 15 ml di campione acquoso.

A questo punto, la membrana viene nuovamente riempita con 500 μl di esano e 1 μl di standard interno di simatrina; si pone in agitazione a una determinata temperatura e dopo un tempo scelto di estrazione si preleva l'estratto organico con una microsiringa che va trasferito nelle *via/s* per essere iniettato in GC-MS.

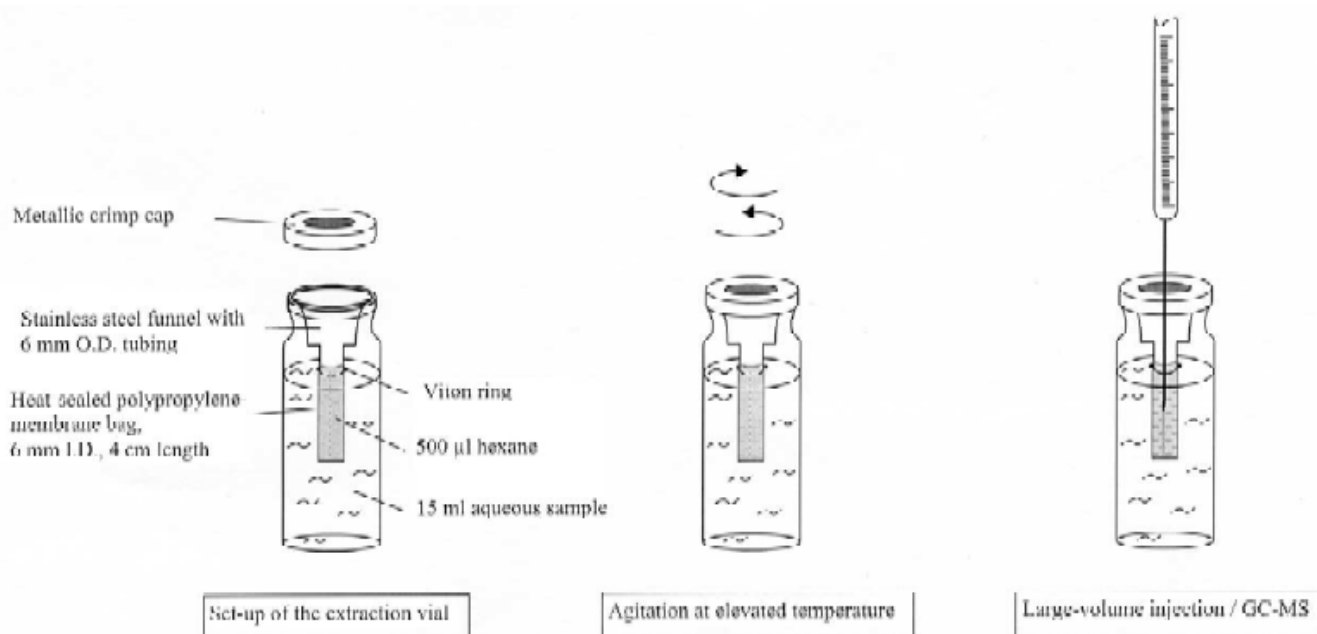


Figura 5.4.2.3 – Dispositivo per estrazione LLE in-vial²⁸

Si devono ottimizzare temperatura, velocità di agitazione e tempo di estrazione. Con una velocità di agitazione pari a 750 rpm, a 55°C e in un tempo di 30 minuti, si ottiene la miglior resa di materiale estratto.

Per validare questo metodo si procede con un'iniezione di 10 μl , e si osserva che la quantità estratta degli analiti target è lineare nel range di concentrazioni tra 0.05 e 100 $\mu\text{g/L}$ con un R^2 minimo di 0.9965 e RSD% che varia tra 2.1-14.3%. Il LOD dopo estrazioni di 30 minuti è in un range tra 10-100 ng/L.

Con un'iniezione di 100 μl dopo 1 ora di estrazione, si raggiunge un LOD tra 1-10 ng/L, un range di linearità tra 0.005-10 $\mu\text{g/L}$ e un R^2 minimo di 0.9970.

In campioni reali di acqua di fiume, i recuperi ottenuti vanno dal 60-100% dopo 30 minuti di estrazione.²⁸

Menezes et al. hanno portato avanti un metodo per un'analisi multiresiduale utilizzando una microestrazione in fase liquida utilizzando una fibra cava (HF-LPME) per la determinazione di diversi pesticidi, tra cui paration metile, clorpirifos e α -endosulfan. Questa tecnica prevede l'uso di una fibra capillare idrofilica porosa, impregnata con un

solvente organico e riempita al suo interno con una fase accettrice; in questo modo questa non andrà in contatto con la matrice rendendo possibile una fase di agitazione durante l'estrazione. HF-LPME può essere utilizzata in due o tre fasi. Con due fasi gli analiti passano da una fase donatrice immiscibile in acqua che riempie i pori della membrana, a una fase accettrice che corrisponde allo stesso solvente. Con tre fasi, invece, l'analita viene estratto da una fase donatrice attraverso un solvente organico immiscibile in acqua per arrivare a una soluzione acquosa accettrice all'interno della fibra. In questo studio è riportato il metodo a due fasi. La fibra è in propilene con un diametro interno di 600 μm e viene inizialmente riempita con 30 μl di solvente utilizzando una microsiringa. La fibra a forma di U, impregnata di solvente, viene collegata a due aghi di siringa e immersa in una *vial* con 15 ml di soluzione acquosa donatrice in cui viene aggiunto uno standard a 100 $\mu\text{g/L}$ composto da un mix di pesticidi. Avviene un'agitazione magnetica e successivamente la fase accettrice viene rimossa con una microsiringa e trasferita in una *vial* per essere iniettata in GC-MS. I parametri da ottimizzare sono il solvente, l'agitazione, l'aggiunta di un sale e il tempo di estrazione. Viene dimostrato che vi è una migliore estrazione in un solvente non polare poiché la solubilità è migliore aumentando il grado di distribuzione tra la soluzione organica accettrice e la soluzione donatrice. La velocità di agitazione scelta è di 200 rpm e l'aggiunta di sale, NaCl, in questo studio non presenta un'influenza positiva nel risultato. Il tempo di estrazione ottimale è di 30 minuti.

Si analizzano 10 pesticidi appartenenti a diverse famiglie e viene raggiunto un range lineare in un range tra 0.14 $\mu\text{g/L}$ e 200 $\mu\text{g/L}$ con un R^2 minimo di 0.9807 e massimo di 0.9999. Il LOD trovato è in un range tra 0.04 e 0.44 $\mu\text{g/L}$ e il LOQ in un range tra 0.14 $\mu\text{g/L}$ e 1.69 $\mu\text{g/L}$. I recuperi trovati variano tra 85.17% e 114.73%.²⁹

La microestrazione a goccia singola (SDME) è un metodo in cui la fase estratta è una goccia di solvente ed è applicabile a campioni gassosi, liquidi e solidi; nonostante questo, è una tecnica con diversi svantaggi, tra cui la difficoltà di ottenere una goccia stabile, la formazione di bolle d'aria, la dispendiosa richiesta di tempo per portarla a termine. La SDME può essere condotta in due modi differenti; tramite immersione diretta, si sfrutta la capacità di una microgoccia di solvente organico di rimanere sulla punta dell'ago della siringa quando questa viene immersa nel campione acquoso. I contaminanti vengono trasferiti dalla matrice acquosa alla fase organica.

Dallo spazio di testa, invece, quando il solvente viene aspirato nella siringa, l'ago viene posto nella *vial* contenente il campione e, per formare la microgoccia, la siringa viene collocata in modo che la punta dell'ago con il solvente sia nella posizione adatta per l'analisi dello spazio di testa.²³

Un esempio di come può essere utilizzata questa tecnica, lo si può trovare nello studio di Pinheiro et al. (2011), in cui vengono ricercati, in campioni acquosi, 4 pesticidi appartenenti alle classi dei piretroidi e degli organofosfato. La SDME si basa sul principio di distribuzione degli analiti tra una microgoccia di solvente organico e la fase acquosa. I composti con un coefficiente di ripartizione elevato possono raggiungere alte concentrazioni, una volta che vengono trasferite per diffusione dal campione alla fase organica. Si utilizza una microsiringa immersa nel campione d'acqua, dall'ago pende una goccia di solvente che rimane immersa nella soluzione acquosa finché il campione viene mescolato. Al termine dell'estrazione, la goccia viene aspirata all'interno della siringa per essere direttamente iniettata in gas cromatografia; in questo modo si combinano una pre concentrazione e l'iniezione in un unico step di estrazione. I parametri da ottimizzare, in questo caso, sono il tempo, la tipologia di solvente, la velocità di mescolamento, la forza ionica, il pH, la temperatura e il volume della goccia di solvente di estrazione. Le condizioni migliori risultano essere: 30 minuti di estrazione con una goccia di 1 µl di toluene con mescolamento a una velocità di 300 rpm. L'effetto dell'aggiunta di un sale e il pH non influenzano il risultato.

Viene studiata la linearità con soluzioni standard di pesticidi a diversi range di concentrazioni per i diversi analiti, trovando per ognuno un valore di R^2 maggiore di 0.90. LOD è tra 0.05 e 0.38 µg/L e LOQ è tra 0.15 e 1.1 µg/L.

I recuperi sono stati testati utilizzando acqua MilliQ e di rubinetto, aggiungendo soluzioni standard con alcuni analiti a 2.5 µg/L e altri a 1.25 µg/L; si ottengono recuperi tra 76.2 e 107%. Per studiare l'effetto matrice su questi risultati, viene usata la stessa procedura per i campioni di acqua di fiume in cui i recuperi risultano essere tra 78 e 110%, valori che dimostrano un piccolo effetto matrice nell'estrazione.³⁰

L'estrazione in fase solida (SPE), invece, rappresenta una valida alternativa alle tecniche di estrazione in fase liquida. Questa tecnica consiste nel far eluire il campione acquoso attraverso un materiale solido in cui gli analiti vengono assorbiti e, successivamente, vengono invece desorbiti grazie a un solvente organico appropriato. I nanotubi di carbonio a parete multipla (MWCNT) sono stati utilizzati come materiale assorbente per questa tecnica.

Anche in questo caso, si cerca di miniaturizzare il processo utilizzando, ad esempio, la microestrazione in fase solida (SPME) che non richiede l'uso di solventi organici ma avviene attraverso l'utilizzo di una microsiringa; gli analiti vengono assorbiti, in questo caso, su di una fibra rivestita da una fase stazionaria adatta.²³

Un'indagine del 2012 ha ricercato i pesticidi carbammati in campioni d'acqua di rubinetto e di tre differenti acque minerali in bottiglia. L'estrazione avviene questa volta tramite SPME e l'analisi eseguita con GC-MS con rivelatore triplo quadrupolo. In una *vial*, a 10 ml di acqua si aggiunge 1 g di cloruro di sodio (NaCl). Successivamente si aggiungono 10 µl di una soluzione di 1-naftil-metilcarbammato a una concentrazione di 100 mg/L e 20 µl di una soluzione a una concentrazione di 50 mg/L, la *vial* viene agitata e mescolata per sciogliere il sale. La SPME viene eseguita con una fibra di 65 µm di polidimetilsilossano/divinilbenzene, immersa nel materiale per 45 minuti a temperatura ambiente e gli analiti vengono poi desorbiti introducendo la fibra nell'iniettore a 270 °C per 6.5 minuti.

Si aggiungono gli standard interni anche per testare la linearità del metodo, che è stata qui valutata con soluzioni a concentrazioni comprese in un range tra 10 µg/L e 0.5 µg/L. Accuratezza e precisione sono valutate invece a tre concentrazioni: 0.08, 5 e 3 µg/L. Si ottengono RSD% compresi tra 1 e 9. LOD e LOQ vengono calcolati considerando il segnale del bianco rispettivamente più 3 volte la deviazione standard e più 10 volte la deviazione standard; entrambi sono in un range tra 0.04 e 1.7 ng/L. I recuperi vanno dal 79.4% al 107.6%.³¹

Uno studio del 2007 ha riportato l'utilizzo della tecnica SPE con MWCNT per un'analisi multiresiduale; in particolare, per l'estrazione di 12 pesticidi, tra cui paration metile, paration etile, fenitrotion, endrin e metoxycloro, analizzati successivamente con GC-MS. Wang et al. (2007) hanno cercato di ottimizzare alcuni parametri, tra cui la tipologia e il volume di solvente utilizzato, la velocità del flusso eluente e il volume di campione estratto. Alla fine, si sono rivelati ottimali l'uso di 5 ml di acetone e un flusso di 3 ml/min. Per quanto riguarda la variazione di volume di campione da usare, essendo costante la quantità di materiale solido adsorbente, il fattore di estrazione non varia significativamente; viene scelto un volume di 500 ml tenendo in considerazione tempi di analisi e applicabilità del metodo in analisi di routine.

La linearità si valuta con soluzioni a concentrazione tra i 0.04 e 4 µg/L e si ottiene un R² pari a 0.99 per tutti e 12 i pesticidi. Il limite di rilevabilità viene calcolato basandosi su un rapporto segnale/rumore paria a 3 e per 500 ml di campione estratto. LOD ottenuto è all'interno di un range tra 0.01-0.03. La ripetibilità del metodo viene infine valutata calcolando la deviazione standard di tre repliche della stessa procedura; gli RSD% trovati sono in un range tra 3.1%-15%. I recuperi ottenuti sono risultati tra 82.0-103.7%.³²

Nell'articolo di Perez-Carrera et al. (2007), si utilizza una metodologia di estrazione in fase solida per un'analisi multiresiduale. La tecnica utilizzata è l'estrazione con ancoretta magnetica adsorbente (SBSE) seguita da desorbimento termico. Questa consiste nell'adsorbimento dei soluti apolari presenti nel campione acquoso su di un'ancoretta in polidimetilsilossano (PDMS) e si basa sulla microestrazione in fase solida. L'ancoretta viene inserita nel campione e in seguito ad agitazione, viene rimossa ed avviene un desorbimento termico, una crioconcentrazione e un'iniezione tramite vaporizzazione a temperatura programmata (PTV). Rispetto alla tecnica classica di SPE, questo metodo permette il raggiungimento di limiti di rilevabilità più bassi e maggiori recuperi, se l'estrazione viene portata a termine con grandi quantità di PDMS.

interessante notare che in questo studio vengono analizzati campioni di acqua di mare, stessa matrice complessa dei campioni presi in esame in questa tesi; gli analiti presi in considerazione qui sono 44, tra cui 16 pesticidi organoclorurati, 2 organofosfati e 7 triazinici. Per ottimizzare le condizioni per l'estrazione sono stati considerati: il volume del campione, la quantità di PDMS, il tempo di estrazione e la forza ionica.

Per la fase di desorbimento è stato selezionato un tempo pari a 7 minuti, è stata scelta una concentrazione di 100g/L di NaCl da aggiungere per aumentare la risposta dei composti che presentavano picchi con aree più basse. Per il volume di campione estratto è stato osservato che la maggior parte dei composti forniscono un segnale più intenso con un volume di 10 ml rispetto a 100 ml, ma viene consigliato l'utilizzo dei 100 ml quando gli analiti danno recuperi comparabili e le concentrazioni degli analiti sono molto basse; per questo motivo viene scelto quest'ultimo volume come quello ottimale con un tempo di estrazione di 14 ore.

Per la maggior parte dei composti i recuperi risultano essere per tutti attorno al 70%, vengono forniti i limiti di rilevabilità sia con l'uso di 10 ml di campione, sia con 100 ml. Nel primo caso LOD è nel range tra 1-50 ng/L e nel secondo caso tra 0.1-7.5 ng/L. I valori di R^2 vanno da un minimo di 0.830 a un massimo di 0.997 per l'estrazione ad alto volume, mentre da 0.811 a 0.999 per il basso volume. La linearità resta valida per concentrazioni tra 5 e 500 ng/L. Per quanto riguarda la ripetibilità, il metodo presenta precisione tra 50 e 200 ng/L con RSD% tra 1-12% e tra 0.5-17% rispettivamente per 100 e 10 ml; si può affermare la robustezza del metodo con un RSD% intorno al 15% per entrambi i volumi di estrazione.³³

5.4.3 Confronto tra i metodi presi in esame

Per poter stabilire quale sia la tecnica più adatta all'estrazione di fitosanitari in campioni di acqua salata provenienti dalla laguna di Venezia, matrice con cui ci si è dovuti confrontare in questo lavoro di tesi, si devono considerare principalmente due aspetti. In primo luogo, è importante tenere presente la necessità di condurre un'analisi multiresiduale, determinando numerosi composti con caratteristiche chimico-fisiche anche molto diverse tra loro; un altro fattore che influisce in modo molto significativo sulla scelta della tecnica pre analitica è l'effetto matrice, conseguenza di caratteristiche come salinità e particolato in sospensione. Quando campioni reali vengono eluiti lungo la colonna cromatografica, alcuni componenti presenti nella matrice stessa, possono interagire con i siti attivi della fase stazionaria, ostacolando o impedendo la corretta ripartizione dei composti target tra i siti attivi dell'adsorbente solido, producendo interferenze che falsano il risultato finale dell'analisi.

Questi fattori non devono essere sottovalutati nella scelta della tecnica estrattiva, perché, come riportato nello studio di Albanis et al. (1995), che prevede l'utilizzo della tecnica SPE, si osserva una diminuzione dei recuperi all'aumentare della complessità della matrice, in particolar modo all'aumentare della percentuale di salinità nel campione si osservano bassi recuperi soprattutto su analiti polari e composti triazinici, mentre non si riscontra un effetto matrice rilevante per analiti come trifluralin, malathion, parathion metile e parathion etile.³⁴

Allo scopo di poter stabilire quale sia la tecnica analitica estrattiva più adatta tra tutte quelle appena descritte si riassumono in tabella le principali caratteristiche/peculiarità di ogni metodo.

Considerato il tipo di matrice da trattare (acqua salata) solo tre delle tecniche prese in esame permettono di effettuare analisi multiresiduale e solo due di queste (SBSE e LLE) raggiungono LOD tali da consentire LOQ consoni a rispettare gli obiettivi di qualità della normativa 39/2013 UE.

Tabella 5.4.3.1 – Confronto tra i metodi di estrazione riportati nel capitolo 7.4.2

Metodo di estrazione	Analiti target	Analisi multiresiduale	LOD ($\mu\text{g/L}$)	Recupero %	Tempo di estrazione	Tipologia matrice
MLLE	Endosulfan e Piretroidi	No	0.003-0.035	94-125.2 ^(a) 95.1-106.8 ^(b)	~ 2 minuti	Acque di superficie, mare e rubinetto
DLLME	34 pesticidi	Sì	0.0032-0.017	84-108 ^(c) 86-115 ^(d)	~ 3 minuti	Varie matrici (fiume, lago, mare...)
VALLME	Pesticidi clorurati	No	0.011-0.052	76-102 ^(e) 78-106 ^(f) 78-104 ^(g)	~ 7 minuti	Varie matrici (rubinetto, lago, ruscello...)
LPME	Pesticidi organofosfati	No	0.042-0.200	83.1-107	50 minuti	Acqua di lago
LLE <i>in vial</i>	Pesticidi triazinici	No	0.010-0.100	60-100	30 minuti	Acqua di fiume
HF-LPME	10 pesticidi	Sì	0.040-0,440	85.17-114.73	30 minuti	Acque superficiali
SDME	4 pesticidi	Sì	0.05-0.38	76.2-107 ^(h) 78-110 ⁽ⁱ⁾	30 minuti	Acqua di fiume
SPME	Pesticidi carbammati	No	0.00004-0.0017	79.4-107.6	~ 50 minuti	Acqua potabile
SPE con MWCNT	12 pesticidi	Sì	0.010-0.030	82-103.7	30 minuti	Acqua potabile e di fiume

SBSE	44 pesticidi	Si	0.001- 0.050 ⁽ⁱ⁾ 0.0001- 0.0075 ^(k)	~ 70	14 ore	Acqua di mare
LLE (Questo lavoro di tesi)	48 pesticidi	Si	0.00002- 0.0001	40-102 ^(l)	~30 minuti	Acqua di mare

- (a) Recuperi riferiti all'aggiunta di pesticidi a concentrazione nota di 1 ng/ml
- (b) Recuperi riferiti all'aggiunta di pesticidi a concentrazione nota di 5 ng/ml
- (c) Recuperi riferiti all'aggiunta di pesticidi a concentrazione nota di 1 µg/L
- (d) Recuperi riferiti all'aggiunta di pesticidi a concentrazione nota di 50 µg/L
- (e) Recuperi riferiti all'aggiunta di pesticidi a concentrazione nota di 0.1 µg/L
- (f) Recuperi riferiti all'aggiunta di pesticidi a concentrazione nota di 1 µg/L
- (g) Recuperi riferiti all'aggiunta di pesticidi a concentrazione nota di 5 µg/L
- (h) Recuperi riferiti all'aggiunta di pesticidi a concentrazione nota in acqua MilliQ e di rubinetto
- (i) Recuperi riferiti all'aggiunta di pesticidi a concentrazione nota in campioni reali
- (j) Il valore si riferisce a 10 ml di campione
- (k) Il valore si riferisce a 100 ml di campione
- (l) Recuperi riferiti all'aggiunta di due surrogati a concentrazione nota che subiscono tutto il processo di lavorazione dei campioni

Le tecniche (LLE-SBSE) a parità di matrice e di numerosità di analiti determinati riescono a raggiungere limiti LOD tra di loro confrontabili.

Nella tecnica estrattiva LLE si necessita di discrete quantità di solvente organico che alla fine del processo si trasformano in rifiuto pericoloso da smaltire presso centri idonei; la tecnica SBSE, invece, prevede l'uso di quantità estremamente più esigue di solvente. Quest'ultima richiede, però, tempi di estrazione molto lunghi (14 ore) che non sono adeguati e sostenibili per un laboratorio che esegue analisi di routine.

L'obiettivo principale di un metodo pre-analitico per la determinazione e la quantificazione dei pesticidi, è riuscire, con un'unica estrazione e un'unica corsa cromatografica, a isolare ed analizzare un ampio spettro di composti con caratteristiche chimico-fisiche differenti. Per fare questo si devono rimuovere la maggior parte di interferenti presenti nell'estratto, avere elevati recuperi, elevata

sensibilità e precisione, utilizzare la minor quantità di solvente possibile per avere un minor impatto ambientale, ed infine, avere costi bassi, tecniche veloci e semplici.

La combinazione di tutti questi requisiti risulta difficile e sembra non essere ancora una strada completamente percorribile con le tecniche attualmente conosciute.

Inoltre, uno dei motivi più limitanti a queste nuove metodologie estrattive è che il laboratorio del Provveditorato, in quanto organo di controllo agli scarichi e di vigilanza sulla salvaguardia della laguna di Venezia, deve fare riferimento a metodologie normate e riconosciute da enti sia nazionali che internazionali, al fine di poter evitare possibili contestazioni di fronte a contenziosi.

Al momento, il parametro che si può considerare indice della maggior efficienza di un metodo è la percentuale di recupero; quindi, si può affermare che il metodo utilizzato in questo lavoro sia risultato efficace, raggiungendo ottimi recuperi per tutti gli analiti considerati, con tempi di estrazione relativamente bassi e sensibilità non raggiungibili con altre tecniche, che permettono di soddisfare quelli che sono gli standard di qualità (SQA) previsti dalle direttive europee.

Lo svantaggio maggiore dell'estrazione liquido-liquido, come sopraesposto, è il largo utilizzo di solventi organici a cui si deve ancora ricorrere per poter soddisfare i requisiti di sensibilità, precisione e robustezza che l'ente deve rispettare.

5.5 CONFRONTO DELLE TECNICHE STRUMENTALI USATE CON QUELLE PRESENTI IN LETTERATURA

Le considerazioni fatte nel paragrafo precedente portano ad affermare LLE come la tecnica più efficace per soddisfare i limiti imposti dalle direttive europee, tenendo presente anche, come sostenuto da Jeon et al. (2007), che questo tipo di estrazione non richiede particolari strumentazioni e ha, di conseguenza, un basso costo.³⁵

Vengono ora presentate e descritte, invece, diverse tecniche strumentali trovate in letteratura per la determinazione di fitosanitari in matrice acquosa, tutte eseguite dopo un'estrazione liquido-liquido.

Le più comuni tecniche strumentali che possono seguire una LLE per la determinazione dei fitosanitari sono:

- GC-MS
- GC-NPD
- GC-ECD
- HPLC-DAD
- HPLC-UV

Per quanto riguarda il rivelatore a cattura elettronica (ECD), si misura la diminuzione di corrente che viene prodotta dalla cattura di elettroni da parte di analiti in uscita dalla colonna, in cui sono presenti, ad esempio, gruppi elettrofili, come gli alogeni. Gli elettroni vengono emessi da un beta-emettitore e sono attratti da un anodo che produce una corrente stazionaria; quando gli analiti con elevata affinità elettronica entrano nel rivelatore catturano gli elettroni. Il rivelatore risponde variando la frequenza per mantenere la corrente costante e la risposta dipende dalla concentrazione degli analiti all'interno del gas carrier; cambiando quindi il flusso del gas, cambia la risposta. Inoltre, non tutti i composti forniscono lo stesso tipo di responso, poiché dipende da diversi fattori: nel caso, ad esempio, di composti clorurati, questi possono dissociare formando ioni cloruro e il segnale in uscita può dipendere dalla posizione e dal numero di ioni cloruro, oltre che dalla velocità di ricombinazione.

Risulta necessario, quindi, l'uso di standard interni ed esterni per la quantificazione ed è necessario sottolineare che, con questo tipo di detector, si possono eseguire analisi di composti target ma non risulta affidabile per l'identificazione di sostanze ignote.

Nello studio di Jeon et al. (2007), in cui si utilizza un sistema GC-ECD, si aggiungono inizialmente 100 ml di acetone al campione per poi omogeneizzarlo, filtrarlo in un Buchner con filtro di carta e inserirlo all'interno di un imbuto separatore. Dopo l'aggiunta di una soluzione di sodio solfato viene concentrato con rotavapor a 2-3 ml e, infine, viene purificato con SPE.

L'analisi si esegue con GC-ECD utilizzando un autocampionatore, una colonna capillare in silice fusa ricoperta con 5%fenil-95%metilpolisilossano di dimensioni 30m x 0.25 mm x 0.25 µm. Viene iniettato 1 µl di campione in modalità *split*, il gas carrier è azoto a un flusso di 1ml/min.

La temperatura dell'iniettore è di 250 °C mentre quella iniziale del forno gascromatografico è di 130 °C e viene mantenuta per due minuti. Comincia poi il riscaldamento, inizialmente a una velocità di 7°C/minuto fino ad arrivare a 200°C; poi aumenta di 2°C/minuto fino a una temperatura di 220°C che viene mantenuta per 4 minuti. In ultimo, si riscalda ancora di 10 °C/minuto fino ad arrivare a 300°C, temperatura che si mantiene per 6 minuti.

Come affermato in precedenza, con questo tipo di detector non si ottengono analisi affidabili, GC-ECD, infatti, può dare falsi positivi, quindi alla fine dell'analisi si deve utilizzare anche un sistema GC-MS per confermare la determinazione degli analiti trovati.

I recuperi risultano tra 80 e 107%, LOD e LOQ risultano rispettivamente nei range 0.001-0.063 ppm e 0.003-0.188 ppm.³⁵

In un lavoro del 2004, invece, si utilizza la gascromatografia con due rivelatori: ECD e un rivelatore ad azoto e fosforo (NPD).

Quest'ultimo, attraverso una fiamma idrogeno/aria, ionizza gli analiti al loro passaggio. Una sferetta di alcali di cloruro di cesio o rubidio viene riscaldata da una bobina; la sferetta calda emette elettroni fornendo una corrente di fondo. Quando composti contenenti azoto o fosforo escono dalla colonna, vengono parzialmente combusti e assorbiti sulla superficie della sferetta. Questo provoca l'aumento dell'emissione di elettroni e di conseguenza della corrente misurata. L'analisi degli idrocarburi con questo tipo di rivelatore può dare rumore di fondo riducendo la sensibilità della tecnica.

In questo caso 1 litro di campione viene estratto in un imbuto separatore con aggiunta di composti organofosfati a concentrazione nota in 100 µl di acetone. Dopo 3 aggiunte

da 100 ml di diclorometano e un passaggio attraverso un filtro con sodio solfato, l'estratto viene concentrato fino a un volume di 1 ml.

La temperatura di iniezione in questo caso è di 300 °C, il gas carrier è idrogeno mantenuto a un flusso costante di 1.1 ml/min.

La temperatura iniziale della colonna è 80°C e resta tale per 2 minuti. Inizia poi il riscaldamento a una velocità di 10°C/minuto fino ad arrivare a 160°C e poi fino a 265°C a 3°C/minuto; la temperatura finale viene mantenuta per 15 minuti.

I recuperi trovati sono in un range tra 76 e 102%, anche se alcuni analiti subiscono variazioni anche del 30% con l'aumentare della purezza dei campioni; LOD è in un range tra 0.003 e 0.029 µg/L.³⁶

In letteratura sono presenti anche studi su analisi di pesticidi in acqua con cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Nella maggior parte dei casi, quando si utilizza questa tecnica analitica, il campione viene iniettato direttamente, ma, in un articolo pubblicato nel 2006 è stata utilizzata l'estrazione liquido-liquido per poi analizzare i campioni con HPLC e rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi (DAD).

Per utilizzare questo tipo di rivelatore si devono selezionare i valori di lunghezza d'onda (λ) più adatti a cui lavorare per massimizzare la sensibilità; in questo modo si può registrare lo spettro completo della λ selezionata. Una lampada produce una luce nel range dell'ultravioletto (UV) che poi viene scissa nelle sue componenti attraverso un monocromatore a gradini. Viene misurata l'intensità della luce trasmessa ad ogni λ e vengono registrati gli spettri in continuo durante l'analisi. Inoltre, si possono registrare i cromatogrammi a ciascuna lunghezza d'onda.

Nello studio di Parrilla e Vidal (1997) in cui viene usata questa tecnica analitica, i campioni di acqua vengono estratti in un imbuto separatore con aggiunte di 100 ml di diclorometano, si filtrano con sodio solfato anidro e si concentra l'estratto con rotavapor a 5 ml.

Per iniettare in HPLC si discioglie il residuo in 1 ml di soluzione di acetonitrile e acqua in rapporto 1:1.

Con questa tecnica si esegue una programmata di solventi iniziando con 2 minuti di eluizione isocratica con una soluzione con la seguente composizione: 56% acqua, 27% acetonitrile e 17% metanolo. Successivamente si passa a un'eluizione a

gradiente lineare per arrivare a una soluzione 5% acqua, 5% metanolo e 90% acetonitrile.

I recuperi risultano essere tra 78 e 120 % tranne che per un analita, il diclorvos, per cui si trovano recuperi bassi.³⁷

Un'alternativa al rivelatore DAD è il detector a ultravioletti (UV), composto da una lampada a deuterio che emette luce UV; questa viene poi scissa nelle sue componenti attraverso un monocromatore. L'intensità della luce trasmessa è proporzionale alla concentrazione dell'analita e viene misurata da un fotodiode.

In uno studio del 2005 vengono testati diversi tipi di estrazione per questa tecnica strumentale. Per quanto riguarda l'estrazione LLE, dopo aver purificato 100 ml di acqua con un sistema Milli-Q e aver arricchito il campione con una miscela di standard a una concentrazione di 1 mg/ml, vengono fatte 3 aggiunte di 60 ml di diclorometano per estrarre gli analiti dalla matrice acquosa.

Per l'analisi cromatografica viene utilizzato un HPLC-UV usando come fase mobile una miscela di acetonitrile e acqua. Vengono determinati 5 pesticidi e si raggiungono LOD tra 10 e 30 µg/L e LOQ tra 30 e 100 µg/L. I recuperi con l'estrazione liquido-liquido si trovano in un range tra 94.3 e 95.8 %.³⁸

La gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa, invece, viene ampiamente utilizzata per la determinazione di composti volatili e semivolatili con sensibilità e selettività soddisfacenti. Il singolo quadrupolo era uno degli analizzatori più comunemente usati; questo analizzatore, però, viene quasi sempre utilizzato con l'estrazione in fase solida e non sempre riesce ad assicurare i requisiti di selettività e sensibilità richiesti a causa della combinazione.

Questo problema ha portato a un più largo utilizzo della trappola ionica o del triplo quadrupolo, che permettono di lavorare in modalità MS-MS. Tale modalità minimizza le interferenze date dalla matrice e il rumore di fondo nel cromatogramma, migliorando le prestazioni dell'analisi.

Nell'articolo di Kuster et al. (2006) l'analizzatore triplo quadrupolo viene riconosciuto come la migliore opzione per la determinazione di analiti target; il miglior vantaggio nell'utilizzo di questo detector per la determinazione di residui di pesticidi lo si trova nell'elevata selettività e sensibilità che si riesce ad ottenere.³⁹

Considerando le tecniche strumentali utilizzate come alternativa alla GC-MS, si può affermare che nessuna di queste sia più conveniente per quanto riguarda l'analisi dei pesticidi in matrice acqua con estrazione LLE.

Infatti, vagliando le possibilità riscontrate in letteratura, si può affermare che: usando il rivelatore ECD c'è la necessità di utilizzare un'altra tecnica di conferma poiché ci possono essere dei falsi positivi, con ECD e NPD si osserva una perdita di precisione alla variazione della purezza dei campioni, con HPLC-DAD, è stato dimostrato che la tecnica di estrazione più adatta sia la SPE e non la LLE, e con HPLC-UV solo pochi analiti possono essere determinati simultaneamente.

Dopo aver fatto le considerazioni soprastanti in merito alle varie tecniche strumentali, si può stabilire che accoppiare la cromatografia alla spettrometria di massa sia la scelta più efficace poiché permette di fare simultaneamente un'analisi quantitativa e qualitativa con elevate performance, risparmiando tempo e lavoro. In questo lavoro di tesi è stato quindi scelto l'utilizzo della tecnica GC-MS/MS, interfacciando un gascromatografo con uno spettrometro di massa con analizzatore triplo quadrupolo.

Capitolo 6

MESSA A PUNTO DEL METODO STRUMENTALE

6.1 STUDIO DELLE TRANSIZIONI DI MASSA CARATTERISTICHE

L'identificazione degli analiti di interesse avviene iniettando e acquisendo inizialmente in *full scan* diverse soluzioni, contenenti gli standard elencati nella Tabella 5.1.1, a una concentrazione di 500 pg/μl.

I composti, con i relativi tempi di ritenzione, vengono riconosciuti tramite il confronto con la libreria.

A questo punto le stesse soluzioni vengono reiniettate e acquisite in modalità AutoSRM, che permette di automatizzare, ottimizzare e semplificare il metodo SRM.

In questo modo si verificano le transizioni di massa caratteristiche e si ottimizzano le energie di collisione allo scopo di ottenere la miglior frammentazione possibile.

Lo studio AutoSRM si compone di tre sezioni:

- lo studio degli ioni precursori
- lo studio degli ioni prodotti
- ottimizzazione del metodo SRM

L'obiettivo del primo studio è quello di selezionare gli ioni precursori. Per questo tipo di analisi, inizialmente viene inserita la lista di composti di interesse con i relativi tempi di ritenzione. Il programma crea automaticamente finestre centrate sul tempo di ritenzione di ciascun composto, una indipendente dall'altra. I tempi di testa e di coda di ogni finestra sono regolabili, in modo che, in caso di shift dei tempi dovuti a un possibile effetto matrice, le sostanze restino all'interno del range selezionato. Utilizzando questo strumento si ottengono principalmente due vantaggi:

- ogni composto è centrato all'interno della sua finestra e, in questo modo, il metodo è più solido rispetto al metodo classico in cui c'è il rischio di perdere picchi quando composti comparabili cadono vicino al limite della finestra;

- si riduce notevolmente la quantità di transizioni simultanee in esecuzione contemporaneamente. Grazie a questo, si ottiene una maggiore sensibilità e un dwell-time più efficace.

Dal primo step dello studio in AutoSRM si ottiene un elenco delle masse più abbondanti, corrispondenti ai picchi più intensi, al tempo di ritenzione indicato; a questo punto si selezionano gli ioni precursori che si desidera inserire nella *working list*. Oltre a quelle individuate automaticamente, si ricercano le transizioni caratteristiche dei composti presenti in letteratura, e qualora non siano fornite dallo strumento, si acquisiscono separatamente in modalità MRM. Nel metodo di acquisizione vengono inserite inizialmente tutte le transizioni trovate per poter verificare quali siano quelle ottimali per uno standard a concentrazione bassa, poiché l'AutoSRM non può essere eseguito in queste condizioni.

Si possono trovare ora le masse prodotto attraverso il secondo studio. Il TSQ acquisisce scansioni degli ioni prodotto a tre diverse energie di collisione: 10, 20 e 30 eV, in modo da avere un buon range di valori di energia in cui cercare i migliori ioni figli. Il software, inoltre, decide se eseguire iniezioni multiple qualora i composti abbiano tempi di ritenzione troppo vicini o se vi siano più ioni precursori per un singolo composto. Come nel primo caso, al termine dell'analisi si selezionano i risultati migliori che qui corrispondono alle masse risultate più abbondanti a una determinata energia di collisione. Si ottiene una nuova *working list* da cui procedere per l'ultimo studio: l'ottimizzazione. Si acquisiscono, quindi, le transizioni scelte a diverse energie di collisione; il sistema ha la capacità di analizzare tre transizioni per composto, ognuna per 10 valori di energia. L'ottimizzazione utilizzata in questo lavoro testa un range di energia partendo da 5 eV, aumentando di volta in volta di 5 eV, fino ad arrivare a 50 eV.

Nella *Tabella 6.1.1* vengono elencate le due transizioni di massa più abbondanti ottenute per ogni analita indicando prima quella che verrà poi usata come massa quantificatrice e poi quella usata come qualificatrice.

Tabella 6.1.1 - Elenco transizioni di massa fitosanitari ricercati

Nome composto	Massa genitore	Massa figlia	Energia di collisione
(SID) NAFTALENE d8	136.2	108.1	20
	136.2	134.1	15
DICLORVOS	109.0	79.0	5
	185.0	93.0	10
(SURR)2-FLUOROBIFENILE	171.1	170.1	15
	172.1	171.1	15
MEVINFOS	127.0	109.0	10
	192.0	127.0	15
(SID) ACENAFTENE d10	162.2	160.1	20
	164.2	162.1	15
ISOPROTURON	146.1	128.1	10
	178.1	146.1	10
DEMETON-O	88.1	60.0	5
	60.0	45	15
TRIFLURALIN	306.1	264.1	5
	264.0	160.1	15
ALFA-BHC	180.9	145.0	10
	216.9	181.0	5
DIMETOATO	125.0	79.0	15

	229.0	87.0	5
SIMAZINA	186.1	91.0	10
	201.1	173.1	5
BETA-BHC	180.9	145	10
	183.0	147.0	10
ATRAZINA	215.1	200.1	5
	200.1	122.1	10
GAMMA-BHC	180.9	145	10
	182.9	147	10
TERBUTILAZINA	173.1	172.1	10
	214.1	132.1	10
(SID) FENANTRENE d10	188.2	160.1	20
	188.2	158.1	35
DELTA-BHC	180.9	145	15
	218.9	182.9	5
PARATION METILE	263.0	109.0	10
	125.0	79.0	5
EPTACLORO	271.8	236.9	10
	273.8	238.9	10
TERBUTRINA	185.0	170.1	5
	241.1	170.2	15
FENITROTION	125.0	79.0	10

	279.0	87.0	5
MALATION	127.0	99.0	5
	173.1	99	12
ALDRIN	260.8	190.9	30
	262.9	192.9	30
ALACLORO	146.1	118.1	10
	146.1	131.1	10
FENTION	278.0	109.0	18
	278.0	124.9	20
CLORPIRIFOS	197.0	169.0	10
	199.0	171.0	10
PARATION ETILE	109.0	81.0	10
	139.0	109.0	5
4,4'- DICLOROBENZOFENONE	139.0	111.0	15
	139.0	75.1	25
ISODRIN	193.0	123.0	30
	193.0	157.0	20
CLORFENVINFOS ALFA	170.0	99.1	25
	266.9	159.0	15
EPTACLORO EPOSSIDO ISOMERO B	352.8	262.9	10
	354.8	264.9	10
CLORFENVINFOS BETA	266.9	159.0	15

	170.0	99.1	25
TRANS-CLORDANO	372.9	265.9	20
	374.9	267.8	20
BETA-ENDOSULFAN	206.9	170.0	15
	195	159	15
CIS-CLORDANO	372.8	265.9	20
	374.8	265.9	20
4,4'-DDE	246.0	176.1	25
	248.0	176.1	25
(SURRE) p-TERFENYL d14	244.2	240.2	25
	244.2	242.2	15
DIELDRIN	262.9	193.0	35
	262.9	191.0	35
ENDRIN	242.9	173.0	25
	209.0	139.1	25
ALFA-ENDOSULFAN	240.9	206.0	10
	207.0	172.0	10
4,4'-DDD	235.0	165.1	20
	237.0	165.1	20
ACLONIFEN	212.0	182.0	10
	194.1	139.1	20
ENDRIN ALDEIDE	67.1	41.1	10

	209.0	139.0	15
CHINOSSIFEN	237.0	208	25
	238.1	209.1	25
ENDOSULFAN SOLFATO	272.0	237.0	20
	272.0	117.0	40
4,4'-DDT	235.0	165.1	20
	165.1	164.1	20
ENDRIN CHETONE	209.0	139.1	25
	316.9	245.0	10
(SID) CRISENE d12	240.2	236.1	25
	240.2	238.1	15
METOSSICLORO	227.1	169.1	20
	238.1	223.1	10
DICOFOL	139.0	111.0	10
	139.0	75.1	25
AZINFOS METILE	132	77	12
	160	77	15
(SID) PERILENE d12	260.2	256.1	35
	264.2	260.1	35

6.2 SMART TUNE

Per ottimizzare le condizioni strumentali il software permette l'utilizzo dello Smart Tune. Inizialmente avviene un check per identificare eventuali errori; se non ce ne sono, prosegue e alla fine del *tune* fornisce un report con le informazioni che permettono di capire se lo strumento ha tutti i requisiti per dare le performance migliori. Si controlla che non ci siano perdite alla voce "leak check", si considera in buono stato per valori tra 1-5%. Si osserva, poi, l'intensità dei picchi per le masse 69, 131, 219, 414 e 502, del PFTBA, che arriva a ordini di grandezza di 10^8 - 10^9 . Dal voltaggio dell'elettromoltiplicatore, "detector gain", si può verificare la pulizia della sorgente; infatti, se dalla sorgente arrivano pochi frammenti, viene applicato un voltaggio maggiore per avere comunque un buon segnale. Un valore nella norma è attorno ai 1100 V, mentre valori attorno ai 2000-2200 V indicano la necessità di pulire la sorgente.

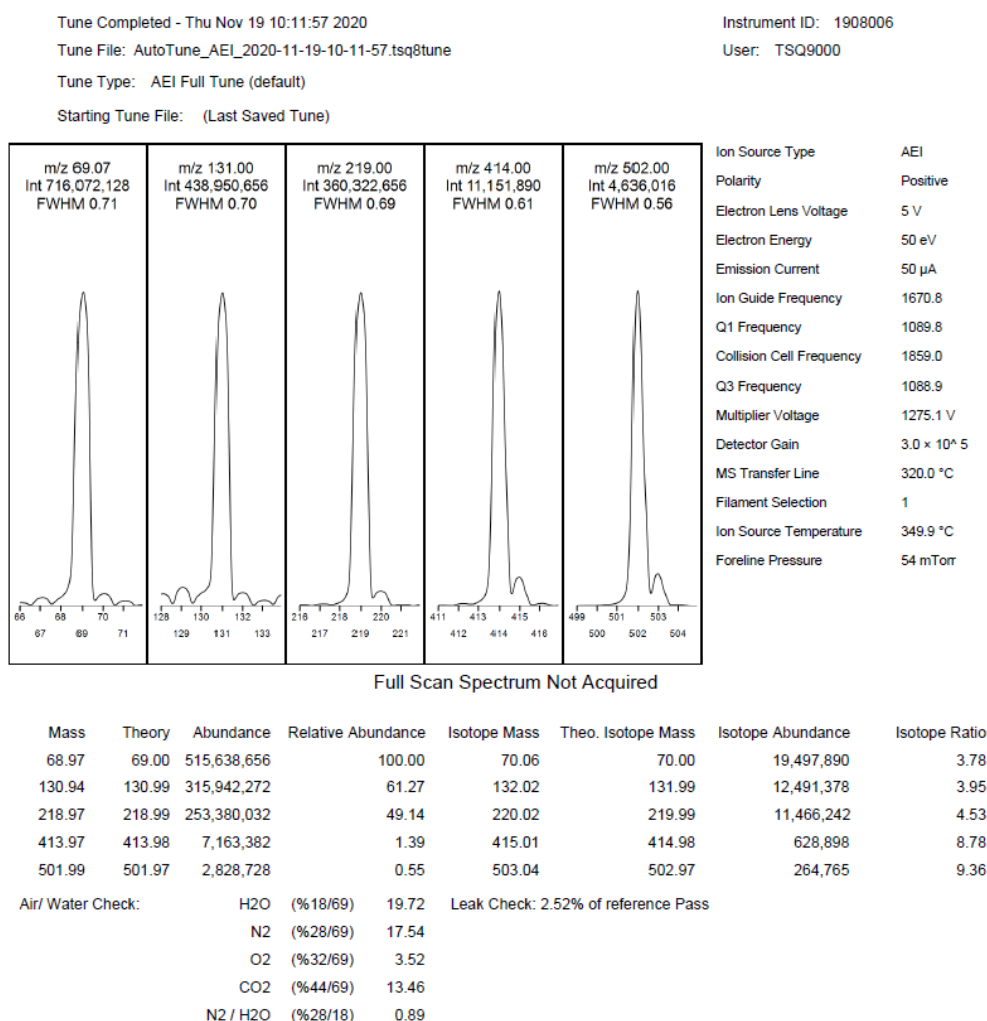


Figura 6.2.1 – Report Smart Tune

In *Figura 6.2.1* viene presentato un report dello Smart Tune effettuato prima di iniziare le analisi con le relative impostazioni (*Figura 6.2.2*).

Tune Settings

Device	Mass	Value
Repeller Voltage	219	0
Lens 2 Negative Voltage	219	-7
Lens 3 Voltage	219	-57
Ion Guide Voltage	40	-3.4
Ion Guide Voltage	69	-3.4
Ion Guide Voltage	219	-8
Ion Guide Voltage	502	-8.5
Ion Guide RF Amplitude	40	15.03
Ion Guide RF Amplitude	69	18.87
Ion Guide RF Amplitude	219	56.97
Ion Guide RF Amplitude	502	100.31
Q1 Entrance Lens	40	-6.4
Q1 Entrance Lens	69	-6.4
Q1 Entrance Lens	219	-9
Q1 Entrance Lens	502	-11.5
Q1 Voltage	69	-3.95
Q1 Voltage	219	-5
Q1 Voltage	502	-7
Q1 RF Amplitude	9	5.69
Q1 RF Amplitude	1100	758.47
Q1 Resolution	69	-0.02
Q1 Resolution	219	-0.06
Q1 Resolution	502	-0.14
Q1 Exit Lens Voltage	69	-4.95
Q1 Exit Lens Voltage	219	-6
Q1 Exit Lens Voltage	502	-8
Q2 Voltage	219	-10
Q2 RF Amplitude	1	1.68
Q2 RF Amplitude	9	2.25
Q2 RF Amplitude	1100	275
Q3 Voltage	69	-3.6
Q3 Voltage	219	-3.9
Q3 Voltage	502	-3.9
Q3 RF Amplitude	9	5.39
Q3 RF Amplitude	1100	746.86
Q3 Resolution	69	-0.01
Q3 Resolution	219	-0.04
Q3 Resolution	502	-0.09
Q3 Exit Lens Voltage	69	-4.6
Q3 Exit Lens Voltage	219	-4.9
Q3 Exit Lens Voltage	502	-4.9

Figura 6.2.2 – Smart Tune settings

6.3 CONDIZIONI OPERATIVE

L'iniezione avviene con iniettore PTV in modalità large volume. Le condizioni operative dell'iniettore e le impostazioni del PTV vengono riassunte nelle *Tabella 6.3.1* e *6.3.2* sottostanti.

Tabella 6.3.1 – Condizioni operative iniettore PTV

IMPOSTANZIONI INIETTORE PTV	
VOLUME INIETTATO	3 µl
TEMPERATURA INIZIALE	50 °C
FLUSSO IN SPLIT	50 ml/min
TEMPO DI SPLITLESS	2 minuti

Tabella 6.3.2 – Impostazioni rampa PTV

RAMPA PTV				
	VELOCITA RISCALDAMENTO (°C/secondo)	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (minuti)	FLUSSO (ml/min)
INJECTION			0.1	10
TRANSFER	5	300	2	
CLEANING	14.5	340	15	50

La scelta della colonna cromatografica da utilizzare si è basata su test eseguiti dal laboratorio in cui è stato svolto questo lavoro di tesi, che hanno individuato la colonna JW HP-5MS come quella più stabile e robusta nel tempo, essendo anche più adatta alle analisi multiparametriche di routine che vengono eseguite nel laboratorio.

Per l'analisi cromatografica è stata quindi installata una colonna capillare in silice fusa HP-5MS J&W (5%-fenil)-metilpolisiloxano di lunghezza 30 metri, diametro 0.25 mm e spessore 0.25 μm .

Le impostazioni del forno del gascromatografo vengono riportate nella *Tabella 6.3.3*.

Tabella 6.3.3 – Impostazioni rampa del forno cromatografico

RAMPA FORNO GC			
TEMPO DI RITENZIONE (minuti)	VELOCITA RISCALDAMENTO (°C/minuto)	TEMPERATURA TARGET (°C)	TEMPO DI MANTENIMENTO (minuti)
0	Inizio corsa		
5	0	40	5
48	8	320	8
48	Fine corsa		

6.4 VALIDAZIONE DEL METODO

I parametri usati per la validazione di questo metodo analitico sono: linearità, range di linearità, precisione, accuratezza, sensibilità, LOD e LOQ.

LOD è stata definito come la quantità minima rilevabile dallo strumento con un *signal to noise* superiore a 3 e RSD% inferiore al 40%.

A causa dei problemi strumentali e dello stato di pandemia già descritti nel capitolo 4, non è stato possibile verificare in modo puntuale LOQ. Non è stato possibile verificare il recupero di 6 campioni drogati alle tre concentrazioni più basse per verificare il recupero di ogni analita a queste concentrazioni. Si è quindi deciso di mantenere come LOQ il secondo punto della retta, verificando che ogni analita identificato avesse un rapporto segnale-rumore superiore a dieci.

La linearità è stata studiata mediante una retta di calibrazione, analizzando una serie di soluzioni standard preparate in diclorometano con i composti target a concentrazioni note.

In particolare, per costruire la retta di calibrazione sono state preparate 9 soluzioni standard in diclorometano a concentrazioni comprese in un range tra 0.2 e 40 pg/μl, utilizzando le soluzioni riportate nel capitolo 7 (materiali e metodi) nella Tabella 7.1.1.

Partendo dalle soluzioni madre si preparano 9 standard intermedi (ICS) a diluizione scalare, con tutti gli analiti a concentrazione doppia rispetto a quelle finali desiderate; si avranno quindi 9 intermedie a concentrazioni comprese tra 0.4 e 80 pg/μl.

Questi ICS si miscelano poi 1:1 con una soluzione intermedia composta dagli standard interni e dai surrogati a una concentrazione di 20 pg/μl.

Si ottengono così soluzioni in cui si trovano tutti gli analiti alle concentrazioni finali desiderate nei rispettivi standard di calibrazione (CS) mentre gli standard interni e i surrogati sono sempre alla stessa concentrazione di 10 pg/μl in ogni CS.

Nella *Tabella 6.4.1* vengono riportati tutti i CS con le rispettive concentrazioni in pg/μl.

Tabella 6.4.1 – Concentrazioni dei composti nelle soluzioni standard utilizzate per costruire la retta di calibrazione

	CS00	CS0	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7
ANALITI	0,2	0,4	0,5	1	2	5	10	20	40
SID + SURR	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Tutti gli analiti mostrano una buona linearità all'interno del range di concentrazioni tra 0.2 e 40 pg/μl, con coefficienti di determinazione (R^2) tra 0.9962 e 0.9999.

Nella *Tabella 6.4.2* vengono riportati tutti i valori di R^2 con i rispettivi RSD%.

Tabella 6.4.2 – Valori di R^2 e RSD% trovati per le rette di calibrazione per ogni singolo analita

Nome Composto	R^2	RSD%
4,4'-DDD	0.9998	2.091
4,4'-DDE	0.9991	4.853
4,4'-DDT	0.9985	6.177
ACLONIFEN	0.9978	7.634
ALACLORO	0.9998	2.447

ALDRIN	0.9997	2.701
ALFA-BHC	0.9996	3.123
ALFA-ENDOSULFAN	0.9982	6.670
ATRAZINA	0.9979	7.632
BETA-BHC	0.9997	2.797
BETA-ENDOSULFAN	0.9999	1.303
CIS-CLORDANO	0.9993	4.321
CLORFENVINFOS ALFA	0.9994	4.138
CLORFENVINFOS BETA	0.9998	2.253
CLORPIRIFOS	0.9986	6.387
DELTA-BHC	0.9998	2.327
DEMETON-O	0.9987	4.243
DICLORVOS	0.9962	8.079
DICOFOL	0.9991	5.109
DIELDRIN	0.9998	2.108
DIMETOATO	0.9985	4.297
ENDOSULFAN SOLFATO	0.9997	2.816
ENDRIN	0.9990	5.069
ENDRIN ALDEIDE	0.9997	1.900
ENDRIN CHETONE	0.9982	6.396
EPTACLORO	0.9997	2.892
EPTACLORO EPOSSIDO ISOMERO B	0.9998	2.238
FENITROTION	0.9992	4.540
FENTION	0.9990	5.277
GAMMA-BHC	0.9995	3.703
ISODRIN	0.9993	4.251
ISOPROTURON	0.9969	8.326
MALATION	0.9999	1.994
METOSSICLORO	0.9978	7.330
MEVINFOS	0.9980	6.946
PARATION ETILE	0.9980	5.577

PARATION METILE	0.9997	2.635
CHINOSSIFEN	0.9991	5.005
SIMAZINA	0.9998	2.447
TERBUTILAZINA	0.9998	2.272
TERBUTRINA	0.9995	3.856
TRANS-CLORDANO	0.9996	3.493
TRIFLURALIN	0.9992	4.419

LOQ viene calcolato considerando il secondo punto della retta (primo punto di quantificazione) per ogni analita, il valore di concentrazione viene poi moltiplicato per il volume finale del campione (100 µL) sul volume estratto (1L). Nella *Tabella 6.4.3* vengono riportati i valori di SQA, il 30% di questi valori il cui raggiungimento deve essere assicurato e i valori di LOQ calcolati per ogni analita.

Tabella 6.4.3 – Valori di SQA, 30% di SQA e LOQ di tutti gli analiti di interesse

Nome composto	SQA normativa (µg/L)	30% SQA (µg/L)	LOQ (µg/L)
ACLONIFEN	0.012	0.004	0.00004
ALACLORO	0.3	0.1	0.00004
ALDRIN	0.005	0.00167	0.00004
ALFA-BHC	0.002	0.00067	0.00004
ALFA- ENDOSULFAN	0.0005	0.00017	0.00004
ATRAZINA	0.6	0.2	0.00004
AZINFOS METILE	0.01	0.00333	0.00004
BETA ENDOSULFAN	0.0005	0.00017	0.00004
BETA-BHC	0.002	0.00067	0.00004
CHINOSSIFEN	0.015	0.005	0.00004

CIS-CLORDANO	0.001	0.00033	0.00004
CLORFENVINFOS ALFA	0.1	0.03333	0.00004
CLORFENVINFOS BETA	0.1	0.03333	0.00004
CLORPIRIFOS	0.03	0.01	0.00004
DELTA-BHC	0.002	0.00067	0.00004
DEMETON-O	0.01	0.00333	0.0001
DICLORVOS	0.00006	0.00002	0.0001
DICOFOL	0.025	0.00833	0.00004
DIELDRIN	0.005	0.00167	0.00005
DIMETOATO	0.2	0.06667	0.0002
ENDOSULFAN SULFATE	0.0005	0.00017	0.00004
ENDRIN	0.005	0.00167	0.00004
ENDRIN ALDEIDE	0.005	0.00167	0.0002
ENDRIN CHETONE	0.005	0.00167	0.00004
EPTACLORO ED EPTACLORO EPOSSIDO ISOMERO B	0.00000001	3.33333E-09	0.00004
FENITROTION	0.01	0.00333	0.00004
FENTION	0.01	0.00333	0.00004
GAMMA-BHC	0.002	0.00067	0.00004

ISODRIN	0.005	0.00167	0.00004
ISOPROTURON	0.3	0.1	0.00004
MALATION	0.01	0.00333	0.00004
METOSSICLORO	0.1	0.03333	0.00004
MEVINFOS	0.01	0.00333	0.00004
PARATION ETILE	0.01	0.00333	0.0001
PARATION METILE	0.01	0.00333	0.00004
SIMAZINA	1	0.33333	0.00004
TERBUTILAZINA	0.2	0.06667	0.00004
TERBUTRINA	0.0065	0.00217	0.00004
TRANS-CLORDANO	0.001	0.00033	0.00004
TRIFLURALIN	0.03	0.01	0.00004
2,4 DDD	0.025	0.00833	0.00004
2,4 DDE	0.025	0.00833	0.00004
2,4 DDT	0.025	0.00833	0.00004
4,4'-DDD	0.025	0.00833	0.00004
4,4'-DDE	0.025	0.00833	0.00004
4,4'-DDT	0.025	0.00833	0.00004

Il valore di LOD è 0.00002 µg/L. Osservando i valori di LOQ si può affermare che è possibile monitorare quasi tutti gli analiti considerati garantendo di raggiungere valori uguali o inferiori a 1/3 SQA, fatta eccezione per eptacloro e diclorvos. Il primo ha come SQA una concentrazione di 0.00000001 µg/L, limite estremamente restrittivo, al momento difficile da raggiungere con qualunque procedura analitica; per il secondo,

invece, un terzo di SQA è di un ordine di grandezza inferiore al LOQ. Per questi analiti non sarà quindi possibile verificare i limiti previsti dalla Direttiva.

Sono state poi effettuate delle prove di ripetibilità replicando 11 iniezioni per standard a bassa (0.2 pg/μl), media (5 pg/μl) ed alta concentrazione (40 pg/μl), calcolando, poi, gli RSD%. Vengono osservati valori in media attorno al 11% per gli standard a bassa concentrazione, attorno al 14% per gli standard a media concentrazione e a più alta concentrazione.

6.5 OTTIMIZZAZIONE METODO INIEZIONE

Per ottimizzare la fase di iniezione con PTV, vengono fatte diverse prove per determinare la migliore modalità di iniezione per il volume di campione scelto. Utilizzando come solvente il diclorometano, si sceglie una temperatura iniziale vicina al valore della sua temperatura di ebollizione, 39,6°C. Vengono iniettati 3 µl di campione con due preventivi lavaggi della siringa con esano. Sono state variate le impostazioni relative alla temperatura iniziale, al flusso di *split*, al tempo di *splitless*, alla velocità di riscaldamento in fase di trasferimento e al flusso in iniezione.

Per determinare le condizioni ottimali è stata utilizzato un canale virtuale del software di gestione strumentale, inserito tramite una formula *custom*, che permette di visualizzare i profili di pressione percepiti in sorgente in base al metodo impostato. Tali profili vengono mostrati nella *Figura 6.5.1* sottostante.

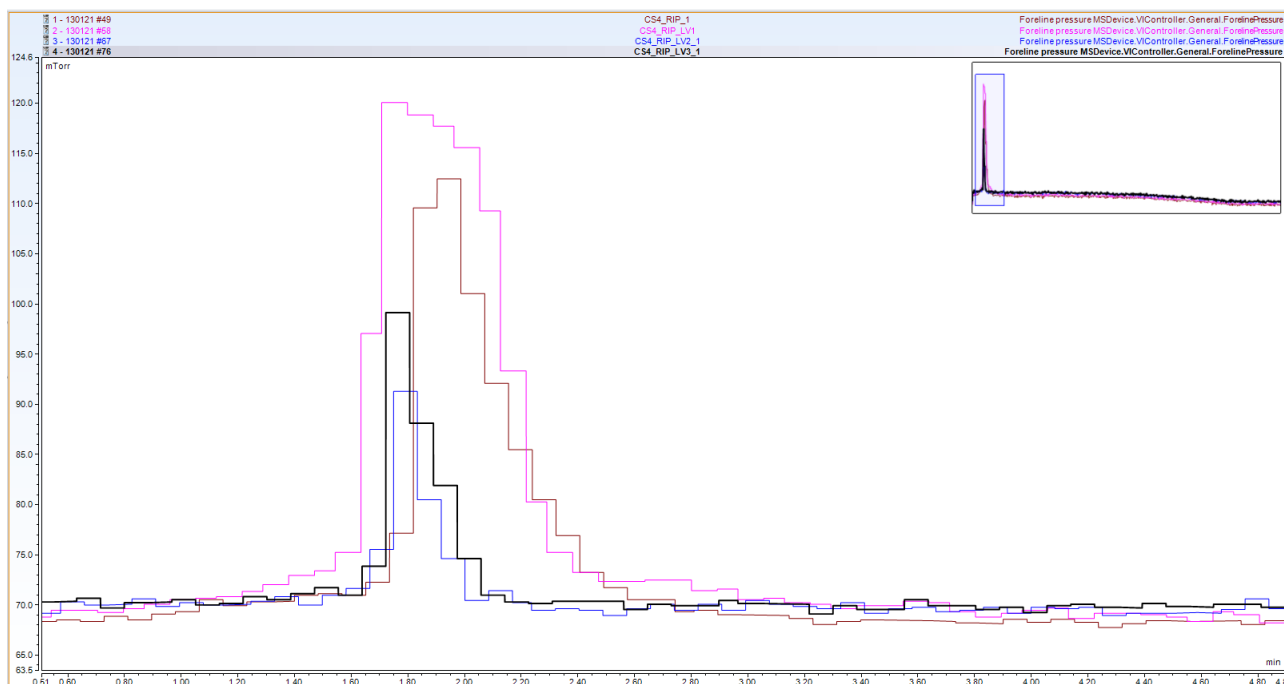


Figura 6.5.1 – Confronto tra i profili di pressione testati per l'ottimizzazione del metodo

Il profilo nero è quello corrispondente al metodo selezionato poiché porta a una differenza di pressione in sorgente meno improvvisa e meno duratura. La temperatura iniziale è stata scelta tra un valore di 40°C e 50°C; la migliore si è dimostrata essere 50°C. Questa viene poi mantenuta per 0.10 minuti, dopodiché comincia a salire a una velocità di 10 °C/min fino ad arrivare a 300°C, temperatura che viene mantenuta per 2 minuti. A questo punto la temperatura ricomincia a salire, questa volta a una velocità

di 14,5 °C/min, per rimanere a 340 °C per 15 minuti. Per quanto riguarda il flusso in *splitless*, tra una velocità di 20 ml/min e 50 ml/min, è stato scelto un flusso di 50 ml/min e un tempo di *splitless* di 2 minuti. Per la rampa del PTV sono stati testati due valori di flusso in iniezione e due valori per la velocità di riscaldamento nella fase di trasferimento: rispettivamente 10 e 20 ml/min e 5 e 10 °C/sec. I parametri ottimali sono risultati essere 10 ml/min e 5°C/sec.

La rampa di temperatura del forno del gascromatografo, invece, parte da 40°C e, dopo 5 minuti, inizia a salire di 8°C/min fino a una temperatura di 320°C. Resta poi a questa temperatura finale per ulteriori 8 minuti. La corsa cromatografica ha quindi una durata totale di 48 minuti.

Nelle *Tabelle 6.5.1* e *6.5.2* sottostanti vengono riassunte le condizioni testate, evidenziando poi i parametri selezionati.

Tabella 6.5.1 – Condizioni operative testate e selezionate per iniettore PTV

IMPOSTANZIONI INIETTORE PTV			
VOLUME INIETTATO	3 µl		
TEMPERATURA INIZIALE	50 °C	40 °C	50°C
FLUSSO IN SPLIT	20 ml/min	50 ml/min	20 ml/min
TEMPO DI SPLITLESS	3 minuti	2 minuti	2 minuti

Tabella 6.5.2 – Condizioni operative testate e selezionate per la rampa di temperature del PTV

RAMPA PTV				
	VELOCITA RISCALDAMENTO (°C/secondo)	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (minuti)	FLUSSO (ml/min)
INJECTION	-	-	0.1	- 10 20
TRANSFER	5 10	300	2	
CLEANING	14.5	340	15	50

Capitolo 7

METODI ANALITICI PER ACLONIFEN E DICOFOL

Nei capitoli 1 e 3 di questa tesi sono stati descritti i principali obiettivi posti dalle Direttive europee a partire dal 2000 per salvaguardare l'acqua in tutto il territorio europeo, perché sia disponibile e più efficacemente usato sia come bene primario, sia dal punto di vista commerciale che dal punto di vista della qualità ambientale.

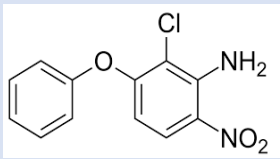
A questo scopo sono state introdotte negli anni nuove sostanze considerate pericolose e alcuni standard per composti già monitorati in quanto dannosi, sono stati resi più restrittivi.

Due delle sostanze tra le 12 introdotte tra i prodotti per la protezione delle piante sono aclonifen e dicofol.

7.1 ACLONIFEN

Aclonifen (nome IUPAC 2 cloro-6 nitro-3-fenossi-anilina) è un erbicida stabile in ambiente acquoso e per questo ha un'elevata capacità di accumulo. Il suo tempo di degradazione va da 15.4 a 16.1 giorni, ma è sufficiente un'esposizione di 96 ore per bloccare la crescita e provocare la morte di alghe e pesci. Le caratteristiche principali di aclonifen vengono riportate nella *Tabella 7.1.1*.⁴⁰

Tabella 7.1.1 – Caratteristiche fisiche e chimiche principali di aclonifen

CAS Number	Struttura chimica	Solubilità in acqua	Log K _{ow} ^(a)	SQA
74070-46-5		1.4 mg/L	4.37	0.012 µg/L

^(a)coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua

Nel "JRC Scientific and policy reports" redatto nel 2012 da Robert Loos, vengono riportati i metodi analitici in linea con la proposta della Commissione Europea riguardo le sostanze prioritarie.

Il primo studio per mettere a punto un metodo adatto alla determinazione di aclonifen in acqua viene fatto nel 2010 attraverso un'analisi SPME-GC-MS. Nello studio in questione avviene un'analisi multiresiduale di 16 pesticidi; l'estrazione viene eseguita con quattro fibre diverse composte rispettivamente da 100 μm di polidimetilsilossano (PDMS), da 85 μm di poliacrilato (PA), da 50 μm di divinilbenzene/carbowax/polidimetilsilossano (DVB/CAR/PDMS) e da 65 μm di PDMS/DVB. Le fibre vengono condizionate prima dell'utilizzo nell'iniettore del gascromatografo in un range di temperature tra 250 e 300°C per un tempo tra i 30 e i 90 minuti. Vengono preparate quattro soluzioni contenenti i pesticidi di interesse a una concentrazione di 500 $\mu\text{g/L}$ in 18 ml acqua ultrapura. L'estrazione avviene in 40 minuti a 50°C, il desorbimento avviene in 5 minuti a una temperatura di 270°C.

Per quanto riguarda invece il sistema GC-MS, viene utilizzata una colonna capillare Zebron-ZB-5MS di lunghezza 60 metri, diametro 0.25 mm e spessore 0.25 μm , l'elio come gas carrier e come modalità di iniezione viene scelta la modalità *splitless*. La ionizzazione avviene mediante impatto elettronico a 70 eV.

Per quanto riguarda la programmata di temperatura del forno, si parte da 60°C, mantenuti per 1 minuto, si riscalda a 18°C/min fino a 160°C, temperatura che viene mantenuta per un altro minuto. Con un ulteriore riscaldamento a 8°C/min si arriva a 230°C per poi finire innalzando ancora a 2°C/min fino a 280°C. La transfer line, l'iniettore e la sorgente sono rispettivamente alle temperature di 150, 270 e 250 °C. Per quanto riguarda aclonifen, si ottiene l'estrazione migliore con la fibra in PDMS/DVB e si nota come l'aggiunta di cloruro di sodio, l'elevate temperature o il tempo di estrazione non influiscano significativamente nell'estrazione di questa sostanza. Il LOQ raggiunto in questo studio non è comunque abbastanza basso da soddisfare i requisiti della Direttiva europea poiché raggiunge 20 ng/L contro i 12 ng/L richiesti.⁴¹

Tournebize et al. (2013) riportano un'analisi di diversi campioni in cui viene determinato, tra altri pesticidi, anche aclonifen. Per alcuni campioni, viene fatta un'estrazione liquido liquido per poi eseguire un'analisi con GC-MS o GC/MS/MS o GC/NPD, mentre altri vengono trattati con lo stesso metodo analitico proposto da Passeport et al. (2010); in entrambi i casi non si riescono a raggiungere i limiti previsti dalle normative europee.⁴²

Nello studio di Guziejewski et al. (2016), viene riportato come aclonifen sia stato analizzato con tecniche ifenate come gascromatografia o cromatografia liquida con spettrometria di massa, ma in tutti gli studi riportati si parla di matrice alimentare mentre rimane ancora limitata la trattazione di questa tecnica per la matrice acquosa.

I metodi finora più sviluppati per la determinazione di questo composto in acqua, riguardano l'ambito dell'elettrochimica, in particolare con l'utilizzo della voltammetria ciclica.

I limiti di rilevabilità riportati con questa tecnica di analisi non arrivano comunque a soddisfare i limiti richiesti dalla direttiva, poiché arrivano ad un range tra 0.77 e 8.20 µg/L.⁴³

Dai riscontri trovati in letteratura risulta chiara la necessità di mettere a punto metodi analitici ad hoc per la determinazione di aclonifen in matrice acquosa, che siano in grado di raggiungere i limiti particolarmente restrittivi imposti dalla direttiva europea. Il metodo messo a punto in questo lavoro di tesi può essere considerato come una buona alternativa per questo scopo poiché riesce a rilevare concentrazioni di aclonifen fino a valori anche di due ordini di grandezza inferiori al valore di SQA della Direttiva 2013/39.

7.2 DICOFOL

Dicofol (nome IUPAC 2,2,2-tricloro-1,1-bis(4-clorofenil)etanolo) è un'acaricida organoclorurato con struttura simile al DDT; per questo si associa a questo pesticida e ai suoi metaboliti per persistenza, bioaccumulo, trasporto a lungo raggio ed effetti negativi su uomo, animali e ambiente. In molti studi sui livelli di concentrazione di contaminanti nell'ambiente in Cina sono stati trovati elevati livelli di sostanze come il 4,4'-DDE, metabolita principale del 4,4'-DDT, che è stato però proibito per l'agricoltura nel 1983. La spiegazione a ciò sta nel largo utilizzo che si fa di dicofol nei territori cinesi. Dicofol viene sintetizzato proprio a partire dal DDT mediante una reazione di clorurazione seguita da un'idrolisi. Il suo metabolita principale è il diclorobenzofenone che si produce in particolare in condizioni basiche, in cui il dicofol è meno stabile. Oltre al DCBP, ci sono numerosi metaboliti di dicofol, che vengono riportati nella *Figura 7.2.1* sottostante.^{15 16}

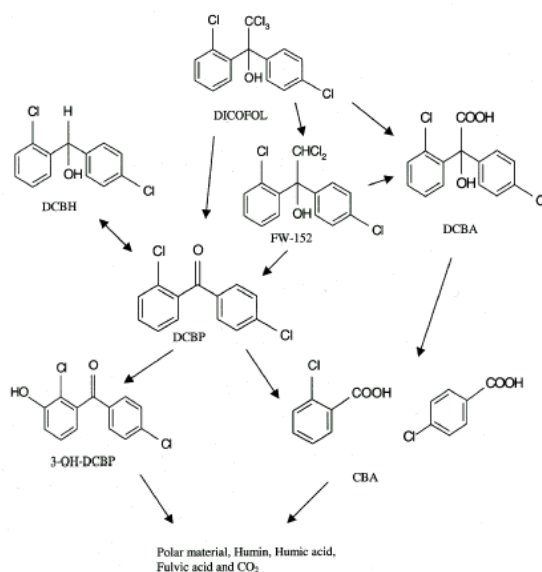


Figura 7.2.1 – Principali metaboliti di dicofol ⁴⁴

Nella Tabella 7.2.1 vengono riportate le caratteristiche principali di dicofol. ⁴⁰

Tabella 7.2.1 – Caratteristiche fisiche e chimiche principali di dicofol

CAS Number	Struttura chimica	Solubilità in acqua	Log K _{ow}	SQA
115-32-2		0.8 mg/L	4.3	3.2x10 ⁻⁵ µg/L

Ha un tempo di emivita pari a 40-50 giorni nel suolo e può raggiungere l'acqua se legato a particolato soggetto a deflusso. In un documento del 2016 dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) si afferma la mancanza di un metodo analitico standard per l'analisi di dicofol in acqua e vengono citati due metodi utilizzati; uno in cui l'analisi viene eseguita con estrazione liquido-liquido e GC-ECD, l'altro in cui l'estrazione avviene in fase solida e l'analisi in large volume con GC-MS. In nessuno di questi viene però raggiunta una sensibilità soddisfacente rispetto ai limiti della Direttiva europea. ⁴⁵

E' stato inoltre dimostrato che l'analisi di questo composto crea problemi con l'utilizzo dei classici metodi di iniezioni utilizzati in gascromatografia, come iniezioni *split/splitless* ad elevate temperature, in quanto tende a degradare in iniettore. Un ulteriore problema è dato dal fatto che il dicofol non è l'unica sorgente di DCPB, che può formarsi direttamente anche dal DDT, e, inoltre, sembra che il grado di degradazione di dicofol vari da iniezione a iniezione causando problemi di ripetibilità.¹⁵ Per tutti questi motivi le classiche tecniche di iniezione utilizzate in GC risultano problematiche per l'analisi di dicofol ed è necessario sperimentare nuovi metodi per permettere la determinazione di questo composto con sensibilità, precisione ed accuratezza.

Uno degli obiettivi di questa tesi era quello di mettere a punto un metodo che fosse valido per la determinazione del dicofol con estrazione liquido-liquido e analisi GC-MS-TQ utilizzando l'iniettore PTV. Basandosi su un *application note* pubblicato dalla Thermo Scientific redatto da Adey et al. (2017) sull'analisi di pesticidi in acqua utilizzando un'iniezione in large volume con PTV, sono state fatte alcune prove con rampe di temperature e di pressione.⁴⁶

Sono stati testati 5 metodi diversi, variando le rampe di temperatura e/o di pressione. L'obiettivo di questi test era di far rimanere il composto per il minor tempo possibile all'interno dell'iniettore, in modo da minimizzarne la degradazione.

Nella *Figura 7.2.2* vengono mostrati i diversi cromatogrammi ottenuti.

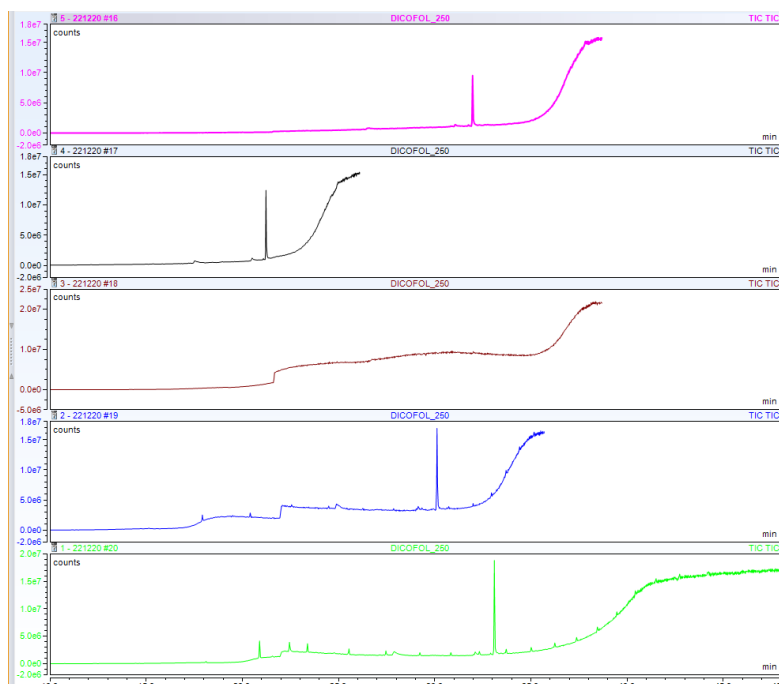


Figura 7.2.2 – Cromatogrammi ottenuti con diversi metodi testati per analisi dicofol

Il cromatogramma verde corrisponde a un'analisi condotta con le stesse impostazioni del metodo (metodo 0) utilizzato per l'analisi di tutti i composti presi in esame in questa tesi, condizioni riportate nelle *Tablelle da 6.3.1 a 6.3.3*.

Il profilo rosa, invece, corrisponde a un'analisi condotta in modalità *splitless* (metodo 1) partendo da una temperatura di 50 °C e una pressione di 55 kPa in iniezione per un tempo di 0.10 minuti, passando a 180 kPa in fase di trasferimento aumentando la temperatura di 5°C/secondo fino a 300 °C, mantenuti per 1 minuto. Per la fase di *cleaning* si mantiene un riscaldamento di 14.5°C/secondo fino a 340°C per 15 minuti con un flusso di 50 ml/min.

Per quanto riguarda la rampa di temperatura del forno per questo metodo, vengono riportate le varie impostazioni nella *Tabella 7.2.2*.

Tabella 7.2.2 – Impostazioni forno cromatografico metodo 1

Tempo di ritenzione (minuti)	Velocità di riscaldamento (°C/min)	Temperatura target (°C)	Mantenimento (minuti)
0.000	Inizio della corsa		
5.000	0.00	40.0	5.00
34.375	8.00	275.0	0.00
38.625	20.00	320.0	2.00
38.700	Fine della corsa		

Per il cromatogramma in nero (metodo 2) la rampa di pressioni parte da 100 kPa in iniettore per 0.10 minuti e arriva a 180 kPa in fase di trasferimento, partendo sempre da 50 °C iniziali con una velocità di riscaldamento di 10 °C/secondo fino a 300°C, mantenuti per 5 minuti. La fase di *cleaning* rimane uguale alla precedente.

Tabella 7.2.3 – Impostazioni rampa di pressioni metodo 2

Tempo di ritenzione (minuti)	Velocità (kPa/min)	Pressione target (kPa)	Mantenimento (minuti)
0.000	Inizio della corsa		
5.000	0.00	200.0	5.00
25.000	5.00	100.0	0.00
26.100	Fine della corsa		

In questo caso viene programmata una rampa di pressioni che viene mostrata nella *Tabella 7.2.3*.

Mentre la rampa del forno in questo caso è riportata nella *Tabella 7.2.4*.

Tabella 7.2.4 - Impostazioni forno cromatografico metodo 2

Tempo di ritenzione (minuti)	Velocità di riscaldamento (°C/min)	Temperatura target (°C)	Mantenimento (minuti)
0.000	Inizio della corsa		
2.000	0.00	40.0	2.00
22.000	12.00	280.0	0.00
26.000	20.00	320.0	2.00
26.100	Fine della corsa		

Il profilo marrone (metodo 3) è stato ottenuto da un'analisi in cui si applica una pressione di 180 kPa in iniettore per 0.10 minuti, partendo da 50°C, si passa a una pressione di 100 kPa in fase di trasferimento aumentando la temperatura di

10°C/secondo fino a 320 °C, mantenuti per 5 minuti. La fase di *cleaning* rimane la stessa.

In questo caso non è stata applicata una rampa di pressioni ma solo una rampa di temperature per il forno cromatografico uguale a quella riportata nella *Tabella 7.2.2*.

Infine, per il cromatogramma colorato in blu (metodo 4), non è stata applicata nessuna pressione né in fase di iniezione né in fase di trasferimento e sono state mantenute le impostazioni di iniezione originali del metodo sviluppato in questo lavoro di tesi.

Per quanto riguarda il forno cromatografico sono state utilizzate le impostazioni riportate nella *Tabella 7.2.5*.

Tabella 7.2.5 - Impostazioni forno cromatografico metodo 3

Tempo di ritenzione (minuti)	Velocità di riscaldamento (°C/min)	Temperatura target (°C)	Mantenimento (minuti)
0.000	Inizio della corsa		
2.000	0.00	40.0	2.00
31.375	8.00	275.0	0.00
35.625	20.00	320.0	2.00
35.700	Fine della corsa		

Osservando i cromatogrammi ottenuti si può affermare che il metodo 3 non può essere considerato valido poiché viene perso completamente il segnale per l'analita in questione, probabilmente per una pressione troppo elevata applicata in iniezione.

Per gli altri metodi si nota uno spostamento dei tempi di ritenzione rispetto al metodo utilizzato inizialmente e le intensità maggiori si osservano proprio con il metodo 0; anche i metodi 2 e 4 hanno dato buone intensità con un picco relativo al dicofol ben risolto.

A causa di un danneggiamento della strumentazione con cui venivano svolte le analisi, non è stato possibile procedere con ulteriori prove migliorando le condizioni dei tre metodi selezionati come i migliori. Si possono considerare queste prove come

una base da cui partire per mettere a punto un metodo che permetta di identificare e quantificare dicofol nei campioni reali, senza che questo degradi nei suoi molteplici metaboliti falsando le analisi.

Capitolo 8

RISULTATI E DISCUSSIONE DEI DATI

Il metodo analitico sviluppato in questo lavoro di tesi viene utilizzato per l'analisi di campioni all'interno di una serie di campagne di monitoraggio della Laguna di Venezia che si sono sviluppate nell'arco di sette mesi, da maggio 2020 a novembre 2020, ad opera del Provveditorato OO.PP.

A causa di alcune problematiche riscontrate durante lo sviluppo di questo studio, già descritte nel capitolo 4, non è stato possibile analizzare con il sistema GC-MS-TQ della Thermo Fisher Scientific tutti i campioni raccolti (54) nelle campagne di maggio, luglio e novembre 2020. I campioni realmente iniettati sono stati, invece, solo 12 in aggiunta a 8 bianchi (campioni di acqua di tipo 3 che hanno seguito lo stesso processo degli altri campioni, dalla fase estrattiva all'iniezione). Qualora venisse trovato un segnale in corrispondenza degli analiti target all'interno dei bianchi, questo dovrebbe essere sottratto al segnale trovato nei campioni reali. In questo caso non è stato rilevato nessun picco nelle regioni dei composti target.

Per poter discutere in modo più ampio i risultati ottenuti e la campagna di monitoraggio totale, sviluppata durante e dopo il lockdown dovuto alla pandemia da Covid-19 per verificare eventuali cambiamenti nella qualità dell'acqua lagunare, vengono presi in considerazione anche i dati ottenuti dall'analisi degli stessi campioni analizzati con un sistema GC-MS-TQ Varian che ha, però, sensibilità inferiore.

Dall'osservazione di questi dati, è stata riscontrata la presenza di picchi cromatografici in corrispondenza di terbutilazina e di azinfos metile per diversi campioni. A causa della minore sensibilità di questo strumento, i picchi rilevati in corrispondenza dei tempi di ritenzione delle sostanze in esame, risultano a concentrazioni al di sotto del limite di quantificazione. La presenza di un segnale sopra il valore del LOD di questa strumentazione, però, indica la possibilità di rilevare questi analiti con una

strumentazione che raggiunge sensibilità più elevate, come il triplo quadrupolo TSQ9000 Thermo Fisher Scientific.

8.1 RISULTATI OTTENUTI DALL'ANALISI DI 12 CAMPIONI DI ACQUA DI LAGUNA

Con il sistema Thermo Scientific sono stati analizzati 12 campioni raccolti nella campagna di maggio 2020, corrispondenti alle stazioni di: Canal Grande-Rialto (30) Rio di San Polo (19), Canal Grande pontile ACTV (31), Rio Croce (35), Rio del Curame (34), Rio di San Gerardo (32), Rio dei Carmini (22), Marittima (36), Tronchetto (38), Canal Grande Campo San Simeon (29), Rio di Cannareggio (15), Rio dei Riformati (14). I numeri tra parentesi corrispondono al numero delle stazioni elencate nel Capitolo 5 e riportate nella mappa in *Figura 5.3.1.1*.

Il volume estratto è pari ad 1 litro e i campioni sono stati portati a un volume finale di 100 µl.

Vengono mostrati nelle *Tablelle* da 8.1.1 a 8.1.3 sottostanti i risultati ottenuti per tutti i composti analizzati per ciascuna stazione sopra elencata; si riportano le concentrazioni in µg/L per gli analiti per cui è stata rilevata una concentrazione maggiore del limite di rilevabilità. Per tutti gli altri composti, invece, per cui o non è stato rilevato nessun segnale o per cui l'*ion ratio* non è stato rispettato, nelle *Tablelle* sarà indicato con "nd", cioè non determinabile, poichè la concentrazione è al di sotto del limite di quantificazione, riportato nella *Tabella 6.4.3*. Tutti gli standard di iniezione (SID) sono stati aggiunti ai campioni a una concentrazione nota di 400 pg/ µl (0,04 µg/L);

Tabella 8.1.1 – Risultati relativi ai campioni raccolti nelle stazioni 30, 19, 31, 35

NOME COMPOSTO	TEMPO DI RITENZIONE	STAZIONE 30	STAZIONE 19	STAZIONE 31	STAZIONE 35
DICLORVOS	16.18	nd	nd	nd	nd
MEVINFOS	19.13	nd	nd	nd	nd
DEMETON-O	21.91	nd	nd	nd	nd

ISOPROTURON	22.03	nd	nd	nd	nd
TRIFLURALIN	22.87	nd	nd	nd	nd
ALFA-BHC	23.3	nd	nd	nd	nd
DIMETOATO	23.61	nd	nd	nd	nd
SIMAZINA	23.91	0.00004	0.00004	0.0010	0.00011
BETA-BHC	24.01	nd	nd	nd	nd
ATRAZINA	24.04	0.00008	0.00007	0.00018	0.00028
GAMMA-BHC	24.19	nd	nd	nd	nd
TERBUTILAZINA	24.43	0.00088	0.00106	0.00215	0.00165
DELTA-BHC	25.06	nd	nd	nd	nd
PARATION METILE	25.72	nd	nd	nd	nd
ALACLORO	25.88	nd	nd	nd	nd
EPTACLORO	26.06	nd	nd	nd	nd
FENITROTION	26.48	nd	nd	nd	nd
TERBUTRINA	26.59	nd	nd	0.00019	0.00019
FENTION	26.68	nd	nd	nd	nd
MALATION	26.73	nd	nd	nd	nd
PARATION ETILE	26.84	nd	nd	nd	nd
CLORPIRIFOS	26.9	nd	nd	nd	nd
ALDRIN	26.94	nd	nd	nd	nd
4,4'-DCBP	27.24	nd	nd	nd	nd

ISODRIN	27.83	nd	nd	nd	nd
EPTACLORO EPOSSIDO ISOMERO B	27.9	nd	nd	nd	nd
CLORFENVINFOS ALFA	28.1	nd	nd	nd	nd
CLORFENVINFOS BETA	28.1	nd	nd	nd	nd
TRANS-CLORDANO	28.46	nd	nd	nd	nd
2,4 DDE	28.53	nd	nd	nd	nd
BETA ENDOSULFAN	28.78	nd	nd	nd	nd
CIS-CLORDANO	28.78	nd	nd	nd	nd
4,4'-DDE	29.32	nd	nd	nd	nd
DIELDRIN	29.42	nd	nd	nd	nd
2,4 DDD	29.52	nd	nd	nd	nd
ENDRIN	29.57	nd	nd	nd	nd
ALFA-ENDOSULFAN	30.16	nd	nd	nd	nd
4,4'-DDD	30.29	nd	nd	nd	nd
ACLONIFEN	30.35	nd	nd	nd	0.00006
2,4 DDT	30.35	nd	nd	nd	nd
ENDRIN ALDEIDE	30.66	nd	nd	nd	nd
CHINOSSIFEN	30.87	nd	nd	nd	nd
ENDOSULFAN SOLFATO	31.06	nd	nd	nd	nd
4,4'-DDT	31.17	nd	nd	nd	nd

DICOFOL	31.93	nd	nd	nd	nd
ENDRIN CHETONE	32.19	nd	nd	nd	nd
METOSSICLORO	32.44	nd	nd	nd	nd
AZINFOS METILE	33.86	0.00005	nd	nd	nd

Tabella 8.1.2 – Risultati relativi ai campioni raccolti nelle stazioni 34, 32, 22, 36

NOME COMPOSTO	TEMPO DI RITENZIONE	STAZIONE	STAZIONE	STAZIONE	STAZIONE
		34	32	22	36
DICLORVOS	16.18	nd	nd	nd	nd
MEVINFOS	19.13	nd	nd	nd	nd
DEMETON-O	21.91	nd	nd	nd	nd
ISOPROTURON	22.03	nd	nd	nd	nd
TRIFLURALIN	22.87	nd	nd	nd	nd
ALFA-BHC	23.3	nd	nd	nd	nd
DIMETOATO	23.61	nd	nd	nd	nd
SIMAZINA	23.91	0.00011	0.00014	0.00011	0.00020
BETA-BHC	24.01	nd	nd	nd	nd
ATRAZINA	24.04	0.00024	0.00024	0.00019	0.00025
GAMMA-BHC	24.19	nd	nd	nd	nd
TERBUTILAZINA	24.43	0.00157	0.00309	0.00252	0.00595
DELTA-BHC	25.06	nd	nd	nd	nd
PARATION METILE	25.72	nd	nd	nd	nd

ALACLORO	25.88	nd	nd	nd	nd
EPTACLORO	26.06	nd	nd	nd	nd
FENITROTION	26.48	nd	nd	nd	nd
TERBUTRINA	26.59	0.00019	0.00022	0.00031	0.00041
FENTION	26.68	nd	nd	nd	nd
MALATION	26.73	nd	nd	nd	nd
PARATION ETILE	26.84	nd	nd	nd	nd
CLORPIRIFOS	26.9	nd	nd	nd	nd
ALDRIN	26.94	nd	nd	nd	nd
4,4'-DCBP	27.24	nd	nd	nd	nd
ISODRIN	27.83	nd	nd	nd	nd
EPTACLORO EPOSSIDO ISOMERO B	27.9	nd	nd	nd	nd
CLORFENVINFOS ALFA	28.1	nd	nd	nd	nd
CLORFENVINFOS BETA	28.1	nd	nd	nd	nd
TRANS-CLORDANO	28.46	nd	nd	nd	nd
2,4 DDE	28.53	nd	nd	nd	nd
BETA ENDOSULFAN	28.78	nd	nd	nd	nd
CIS-CLORDANO	28.78	nd	nd	nd	nd
4,4'-DDE	29.32	nd	nd	nd	nd
DIELDRIN	29.42	nd	nd	nd	nd

2,4 DDD	29.52	nd	nd	nd	nd
ENDRIN	29.57	nd	nd	nd	nd
ALFA-ENDOSULFAN	30.16	nd	nd	nd	nd
4,4'-DDD	30.29	nd	nd	nd	nd
ACLONIFEN	30.35	0.00007	nd	nd	0.00007
2,4 DDT	30.35	nd	nd	nd	nd
ENDRIN ALDEIDE	30.66	nd	nd	nd	nd
CHINOSSIFEN	30.87	nd	nd	nd	nd
ENDOSULFAN SOLFATO	31.06	nd	nd	nd	nd
4,4'-DDT	31.17	nd	nd	nd	nd
DICOFOL	31.93	nd	nd	nd	nd
ENDRIN CHETONE	32.19	nd	nd	nd	nd
METOSSICLORO	32.44	nd	nd	nd	nd
AZINFOS METILE	33.86	nd	0.00019	0.00016	0.00020

Tabella 8.1.3 – Risultati relativi ai campioni raccolti nelle stazioni 38, 29, 15, 14

NOME COMPOSTO	TEMPO DI RITENZIONE	STAZIONE 38	STAZIONE 29	STAZIONE 15	STAZIONE 14
DICLORVOS	16.18	nd	nd	nd	nd
MEVINFOS	19.13	nd	nd	nd	nd
DEMETON-O	21.91	nd	nd	nd	nd
ISOPROTURON	22.03	nd	nd	nd	nd

TRIFLURALIN	22.87	nd	nd	nd	nd
ALFA-BHC	23.3	nd	nd	nd	nd
DIMETOATO	23.61	nd	nd	nd	nd
SIMAZINA	23.91	0.00014	0.00017	0.00024	0.00015
BETA-BHC	24.01	nd	nd	nd	nd
ATRAZINA	24.04	0.00022	0.00023	0.00024	nd
GAMMA-BHC	24.19	nd	nd	nd	nd
TERBUTILAZINA	24.43	0.00394	0.00441	0.00393	0.00328
DELTA-BHC	25.06	nd	nd	nd	nd
PARATION METILE	25.72	nd	nd	nd	nd
ALACLORO	25.88	nd	nd	nd	nd
EPTACLORO	26.06	nd	nd	nd	nd
FENITROTION	26.48	nd	nd	nd	nd
TERBUTRINA	26.59	0.00042	0.00046	0.00022	0.00041
FENTION	26.68	nd	nd	nd	nd
MALATION	26.73	nd	nd	nd	nd
PARATION ETILE	26.84	nd	nd	nd	nd
CLORPIRIFOS	26.9	nd	nd	nd	nd
ALDRIN	26.94	nd	nd	nd	nd
4,4'-DCBP	27.24	nd	nd	nd	nd
ISODRIN	27.83	nd	nd	nd	nd

EPTACLORO EPOSSIDO ISOMERO B	27.9	nd	nd	nd	nd
CLORFENVINFOS ALFA	28.1	nd	nd	nd	nd
CLORFENVINFOS BETA	28.1	nd	nd	nd	nd
TRANS-CLORDANO	28.46	nd	nd	nd	nd
2,4 DDE	28.53	nd	nd	nd	nd
BETA ENDOSULFAN	28.78	nd	nd	nd	nd
CIS-CLORDANO	28.78	nd	nd	nd	nd
4,4'-DDE	29.32	nd	nd	nd	nd
DIELDRIN	29.42	nd	nd	nd	nd
2,4 DDD	29.52	nd	nd	nd	nd
ENDRIN	29.57	nd	nd	nd	nd
ALFA-ENDOSULFAN	30.16	nd	nd	nd	nd
4,4'-DDD	30.29	nd	nd	nd	nd
ACLONIFEN	30.35	nd	nd	nd	0.00007
2,4 DDT	30.35	nd	nd	nd	nd
ENDRIN ALDEIDE	30.66	nd	nd	nd	nd
CHINOSSIFEN	30.87	nd	nd	nd	nd
ENDOSULFAN SOLFATO	31.06	nd	nd	nd	nd
4,4'-DDT	31.17	nd	nd	nd	nd
DICOFOL	31.93	nd	nd	nd	nd

ENDRIN CHETONE	32.19	nd	nd	nd	nd
METOSSICLORO	32.44	nd	nd	nd	nd
AZINFOS METILE	33.86	nd	nd	nd	nd

Dall'analisi dei campioni si può notare come in tutte le zone di campionamento relative a questi 12 punti siano presenti pesticidi triazinici; in particolare la terbutilazina è presente in tutti i campioni analizzati a concentrazioni più elevate rispetto a tutti gli altri analiti. Questo dato va a confermare l'ipotesi fatta inizialmente basandosi sui dati ottenuti dall'analisi con la strumentazione Varian e di conseguenza si può supporre la presenza di questo analita anche in altri punti della laguna.

Si nota una presenza maggiore di questo composto nelle stazioni di Marittima e di Tronchetto dove raggiunge valori di 0.00595 e 0.00441 µg/L.

Oltre a questa classe di composti è stato identificato azinfos metile un organofosfato presente in 7 stazioni a concentrazioni tra 0.00005 e 0.00020 µg/L.

Interessante è, inoltre, la determinazione di aclonifen, uno dei composti di interesse in questo lavoro di tesi data la scarsità di dati relativi alla rilevazione di questo analita con GC-MS in matrice acquosa. Aclonifen è stato trovato in 4 stazioni, con concentrazione massima di 0.00007 µg/L nella zona di Marittima, Rio dei Riformati e Rio del Curame.

Tutti gli analiti determinati hanno un rapporto segnale/rumore molto superiore a 10 e si possono, quindi, considerare quantificabili. Infatti, secondo il metodo EPA 8270, perché possa essere considerata valida la quantificazione è sufficiente un rapporto segnale-rumore superiore a 3. Inoltre, nei bianchi di processo la risposta cromatografica in corrispondenza dei tempi di ritenzione degli analiti target non mostra alcuna positività indice che non vi sono contaminazioni durante il processo di lavorazione.

Per valutare l'efficacia della tecnica estrattiva e della tecnica strumentale utilizzata, sono stati aggiunti in tutti i campioni due surrogati, il 2-fluorobifenile e il p-terfenil-d14, a una concentrazione nota di 0.04 µg/L.

Questi due composti hanno subito lo stesso processo di tutti gli analiti eventualmente presenti nei campioni, dalla fase di estrazione, all'iniezione fino all'analisi con triplo quadrupolo; valutando i recuperi ottenuti si può affermare, in buona approssimazione, la validità del metodo in questa prima fase di sviluppo.

Nella *Tabella 10.1.4* vengono riportate le concentrazioni determinate in µg/L in tutti i campioni per il 2-fluorobifenile e il p-terfenil-d14 con i relativi recuperi percentuali che, per essere accettabili secondo i metodi EPA, devono rientrare in un range tra il 40 e il 120%.

Tabella 8.1.4 – Recuperi % dei due surrogati inseriti a concentrazione nota nei campioni

	SURR 2-FLUOROBIFENILE	SURR p-TERFENIL-d14
STAZIONE 30	0.01606	0.03937
RECUPERO %	40%	98%
STAZIONE 19	0.01625	0.03091
RECUPERO %	41%	77%
STAZIONE 31	0.01705	0.02766
RECUPERO %	42%	69%
STAZIONE 35	0.02297	0.03649
RECUPERO %	57%	91%
STAZIONE 34	0.01734	0.03250
RECUPERO %	43%	81%
STAZIONE 32	0.01678	0.02857
RECUPERO %	42%	71%
STAZIONE 22	0.01596	0.02320
RECUPERO %	40%	58%

STAZIONE 36	0.01651	0.03121
RECUPERO %	41%	78%
STAZIONE 38	0.01612	0.02541
RECUPERO %	40%	63%
STAZIONE 29	0.01596	0.02541
RECUPERO %	40%	63%
STAZIONE 15	0.01626	0.02991
RECUPERO %	41%	75%
STAZIONE 14	0.02178	0.04089
RECUPERO %	54%	102%

I recuperi per il 2-fluorobifenile vanno dal 40 a 57% mentre il p-terfenil-d14 ha recuperi migliori, dal 63 al 102%.

In generale si può affermare che dati i recuperi trovati, il metodo fin qui sviluppato è valido per la determinazione di pesticidi in matrice acqua salata.

CONCLUSIONI

In questa tesi sono stati presentati diversi metodi di estrazione e diverse tecniche di analisi strumentale per la determinazione dei fitosanitari in matrice acquosa. Gli aspetti che sono stati maggiormente tenuti in considerazione sono tre: la possibilità di condurre un'analisi multiresiduale, la capacità di raggiungere limiti di quantificazione abbastanza bassi da poter rispettare gli obiettivi di qualità imposti dalla normativa 39/2013 UE, e l'ottenimento di recuperi accettabili anche in caso di interferenze causate dall'effetto matrice.

Dalla ricerca bibliografica svolta, è emerso come negli ultimi anni si cerchi di miniaturizzare i processi, sia per l'estrazione liquida che per quella in fase solida, in modo da diminuire l'uso di solventi nella fase pre-analitica. Nessuna delle estrazioni trovate in letteratura, però, permette di fare un'analisi multiresiduale con sensibilità elevate come avviene con l'estrazione liquido-liquido. Infatti, la tecnica che permette di raggiungere sensibilità paragonabili è la SPME che, però, analizza solo una classe di composti. Inoltre, le estrazioni in fase solida, in generale, risultano più problematiche quando si lavora con matrici complesse come quelle di acqua salata.

Prendendo in esame le tecniche confrontate, tra quelle in fase liquida, solo DLLME e HF-LPME vengono applicate a un'analisi multiresiduale, portando, però, a LOD di due o tre ordini di grandezza superiori a quello ottenuto con la LLE. Per quanto riguarda, invece, le estrazioni in fase solida, SPME con MWCNT e SBSE riescono a determinare diverse classi di pesticidi in un'unica analisi, ma solo SBSE con sensibilità paragonabili a quelle raggiunte con LLE.

Sono state ricercate anche diverse tecniche strumentali utilizzate per questo tipo di analisi, riscontrando che, per la parte cromatografica, le più utilizzate sono GC e HPLC. Tra i vari rivelatori quello più comunemente utilizzato per l'analisi di pesticidi, accoppiato alla gascromatografia, è ECD. Questo tipo di detector, però, può dare falsi positivi e necessita quindi di una tecnica di conferma. Per questo motivo GC-MS/MS si dimostra essere la più adatta, in quanto permette di fare simultaneamente un'analisi quantitativa e qualitativa con elevate performance.

Dal confronto tra i metodi trovati in letteratura, sia per quanto riguarda la fase di estrazione, sia per quanto riguarda il metodo analitico strumentale, è emerso come l'estrazione liquido-liquido e l'utilizzo di una tecnica ifenata come la gascromatografia accoppiata con la spettrometria di massa con analizzatore triplo quadrupolo, porti a sensibilità al momento difficilmente raggiungibili con altre tecniche.

In questo lavoro di tesi è stato quindi sviluppato un metodo per la determinazione e la quantificazione di fitosanitari in matrice acqua salata con l'utilizzo di un sistema Thermo Fisher Scientific GC-MS/MS composto da iniettore PTV large volume, gascromatografo Trace 1310 e triplo quadrupolo TSQ9000.

Uno degli obiettivi di questo lavoro era quello di mettere a punto un metodo ad hoc per aclonifen e dicofol, entrambi inseriti tra le sostanze prioritarie nella direttiva europea 2013/39. Per aclonifen in matrice acquosa, molti studi trovati in letteratura sono sviluppati utilizzando la voltammetria ciclica, mentre ci sono pochi dati di analisi con il metodo analitico utilizzato nel presente studio, specialmente in matrice acqua salata. Dicofol, invece, causa problemi di degradazione e per questo sono stati testati diversi metodi strumentali utilizzando rampe di temperatura e pressione. Lo scopo delle prove eseguite è quello di minimizzare lo shock termico e il tempo di stazionamento dell'analita all'interno dell'iniettore per diminuire il più possibile la formazione di metaboliti.

A causa di un malfunzionamento della strumentazione utilizzata, che si è protratto per lungo tempo, non è stato possibile ottimizzare e sviluppare dei metodi specifici per questi due analiti di interesse ambientale. Si possono comunque considerare i test eseguiti per dicofol come un punto di partenza per mettere a punto un metodo analitico efficace; mentre, per aclonifen, si è dimostrato valido il metodo fin qui sviluppato, portando alla determinazione di questo pesticida in quattro campioni reali a concentrazioni fino a 0.00006 µg/L. Tale determinazione meriterebbe un ulteriore studio finalizzato ad identificare la fonte di questo pesticida, il cui utilizzo è in deroga fino al 31/12/2021.

Con la tecnica GC-MS-TQ, sono stati quindi analizzati 12 campioni reali portando alla determinazione di diversi pesticidi come simazina, atrazina, terbutrina, terbutilazina, chlorpyrifos, azinfos metile, malation e aclonifen, all'interno dei rii della laguna di Venezia a concentrazioni di ordini di grandezza di 10^{-5} µg/L. Sono stati presi in considerazione anche i dati raccolti con un altro sistema GC-MS/MS presente nel

laboratorio CSMO, dove è stato svolto questo lavoro di tesi. Questa scelta ha permesso di fare delle considerazioni sul monitoraggio ambientale svoltosi nella laguna di Venezia, per verificare se e quali cambiamenti sono stati provocati dal periodo di chiusura a causa della pandemia da Covid-19. Utilizzando questa tecnica meno sensibile, non sono state rilevate concentrazioni sopra i limiti di quantificazione, quindi non è possibile affermare un effettivo cambiamento nella qualità dell'acqua lagunare.

In questa tesi sono state esaminate varie metodologie analitiche, ne sono stati posti in evidenza i pregi e i difetti ed è stata effettuata un'analisi critica delle problematiche relative alla determinazione di tracce e ultratracce di importanti composti per la contaminazione della laguna di Venezia. Inoltre, dalle prime determinazioni sono state poste le basi per lo sviluppo di un metodo preciso e accurato e con un limite di rilevabilità adatto alla loro determinazione.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. Protezione della Laguna di Venezia | Comune di Venezia. <https://www.comune.venezia.it/it/content/tutele-e-vincoli-protezione-laguna-venezia>.
2. L'ambiente lagunare — ARPA Veneto. <https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/acqua/acque-di-transizione/laguna-di-venezia>.
3. MAV. Ufficio di Piano Attività di salvaguardia di Venezia e della sua laguna : lo stato ecologico della laguna Rapporto Tematico. (2008).
4. Le aree sensibili: il caso del bacino scolante in laguna di Venezia | Agriregionieuropa. <https://agriregionieuropa.univpm.it/it/content/article/31/8/le-aree-sensibili-il-caso-del-bacino-scolante-laguna-di-venezia>.
5. Ufficio antinquinamento - Provveditorato. <http://provveditoratovenezia.mit.gov.it/ufficio-antinquinamento-1.html>.
6. Acque, M. A. *et al.* Rapporto sullo stato ambientale delle acque dei rii di Venezia e delle aree lagunari limitrofe - campagna di monitoraggio. (2009).
7. Braga, F., Scarpa, G. M., Brando, V. E., Manfè, G. & Zaggia, L. COVID-19 lockdown measures reveal human impact on water transparency in the Venice Lagoon. *Sci. Total Environ.* **736**, (2020).
8. Direttiva 2009/90/CE - Commissione delle comunità europee. 36–38 (2009).
9. Direttiva 2013/39/UE - Parlamento europeo e consiglio dell'unione europea. 1–17 (2013).
10. Direttiva quadro sulle acque dell'UE. (2000).
11. PF: DEFINIZIONE, COMPOSIZIONE E UTILIZZO. https://www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/GUIDA_PRODOTTI_FITOSANITARI_ED.2015/Capitolo_3.pdf.
12. Jayaraj, R., Megha, P. & Sreedev, P. Review Article. Organochlorine pesticides,

- their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip. Toxicol.* **9**, 90–100 (2016).
13. Aclonifen | Agrimag Info. <https://info.agrimag.it/principi-attivi/5025/aclonifen#tab-caratteristiche>.
 14. Fujii, Y. *et al.* Detection of dicofol and related pesticides in human breast milk from China, Korea and Japan. *Chemosphere* **82**, 25–31 (2011).
 15. Yin, G. *et al.* A refined method for analysis of 4,4'-dicofol and 4,4'-dichlorobenzophenone. *Environmental Science and Pollution Research* vol. 24 13307–13314 (2017).
 16. Donovan, W. Dicofol. *United States Environ. Prot. Agency* 465–475 (2012).
 17. Gazzetta Ufficiale.
https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=1998-06-18&atto.codiceRedazionale=098A5194&elenco30giorni=false.
 18. [https://elearning.unite.it/pluginfile.php/107184/mod_resource/content/1/XII LEZIONE - RIVELATORI GC-HPLC.pdf](https://elearning.unite.it/pluginfile.php/107184/mod_resource/content/1/XII_LEZIONE_-_RIVELATORI_GC-HPLC.pdf).
 19. <https://www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/materiale-didattico/6620>.
 20. <https://people.unica.it/michelabegala/files/2010/06/MS-Lezione-III-analizzatori.pdf>.
 21. <https://www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/materiale-didattico/6747>.
 22. Stocka, J., Tankiewicz, M., Biziuk, M. & Namieśnik, J. Green aspects of techniques for the determination of currently used pesticides in environmental samples. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 7785–7805 (2011).
 23. Tankiewicz, M., Fenik, J. & Biziuk, M. Solventless and solvent-minimized sample preparation techniques for determining currently used pesticides in water samples: A review. *Talanta* **86**, 8–22 (2011).

24. Fernández-Gutiérrez, A., Martínez-Vidal, J. L., Arrebola-Liébanas, F. J., Gonzalez-Casado, A. & Vílchez, J. L. Determination of endosulfan and some pyrethroids in waters by micro liquid-liquid extraction and GC-MS. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **360**, 568–572 (1998).
25. Tankiewicz, M. & Biziuk, M. Fast, sensitive and reliable multi-residue method for routine determination of 34 pesticides from various chemical groups in water samples by using dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **410**, 1533–1550 (2018).
26. Ozcan, S. Viable and rapid determination of organochlorine pesticides in water. *Clean - Soil, Air, Water* **38**, 457–465 (2010).
27. Chen, P.-S. & Huang, S.-D. Determination of ethoprop, diazinon, disulfoton and fenthion using dynamic hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chem. Ecol.* **69**, 669–679 (2006).
28. Hauser, B., Popp, P. & Kleine-Benne, E. Membrane-assisted solvent extraction of triazines and other semi-volatile contaminants directly coupled to large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **963**, 27–36 (2002).
29. Menezes, H. C., Paulo, B. P., Paiva, M. J. N. & Cardeal, Z. L. A Simple and Quick Method for the Determination of Pesticides in Environmental Water by HF-LPME-GC/MS. *J. Anal. Methods Chem.* **2016**, (2016).
30. Pinheiro, A. de S., da Rocha, G. O. & De Andrade, J. B. A SDME/GC-MS methodology for determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. *Microchem. J.* **99**, 303–308 (2011).
31. Cavaliere, B., Monteleone, M., Naccarato, A., Sindona, G. & Tagarelli, A. A solid-phase microextraction-gas chromatographic approach combined with triple quadrupole mass spectrometry for the assay of carbamate pesticides in water samples. *J. Chromatogr. A* **1257**, 149–157 (2012).

32. Wang, S., Zhao, P., Min, G. & Fang, G. Multi-residue determination of pesticides in water using multi-walled carbon nanotubes solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1165**, 166–171 (2007).
33. Pérez-Carrera, E., León, V. M. L., Parra, A. G. & González-Mazo, E. Simultaneous determination of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in seawater and interstitial marine water samples, using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1170**, 82–90 (2007).
34. Albanis, A. & Hela, G. Multi-residue pesticide analysis in environmental water samples using solid-phase extraction discs and gas chromatography with flame thermionic and mass-selective detection. **707**, 283–292 (1995).
35. Jeon, H. R. *et al.* Multiresidue analysis of four pesticide residues in water dropwort (*Oenanthe javanica*) via pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction, and liquid-liquid extraction and gas chromatographic determination. *J. Sep. Sci.* **30**, 1953–1963 (2007).
36. Tse, H., Comba, M. & Alaei, M. Method for the determination of organophosphate insecticides in water, sediment and biota. *Chemosphere* **54**, 41–47 (2004).
37. Parrilla, P. & Martínez Vidal, J. L. Determination of pesticide residues in water using LLE or SPE and HPLC/DAD detection. *Anal. Lett.* **30**, 1719–1738 (1997).
38. Brondi, S. H. G. & Lanças, F. M. Development and validation of a multi-residue analytical methodology to determine the presence of selected pesticides in water through liquid chromatography. *J. Braz. Chem. Soc.* **16**, 650–653 (2005).
39. Kuster, M., De Alda, L. M. & Barceló, D. Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques. *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 900–916 (2006).
40. Loos Robert. Analytical methods relevant to the European Commission's 2012 proposal on priority substances under the water framework directive -

- Publications Office of the EU. 1–66 <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/16079960-5976-428b-b3a4-2af906070325/language-en> (2012).
41. Passeport, E. Efficiency of an artificial wetland and a forest buffer for pesticide pollution mitigation in a tile-drained agricultural watershed. (2010).
 42. Tournebize, J. *et al.* Pesticide de-contamination of surface waters as a wetland ecosystem service in agricultural landscapes. *Ecol. Eng.* **56**, 51–59 (2013).
 43. Guziejewski, D. *et al.* Rapid and sensitive voltammetric determination of aconifen in water samples. *Acta Chim. Slov.* **63**, 1–7 (2016).
 44. Rasenberg, M. H. . & Plassche, E. J. van de. Risk Profile and Summary Report for Dicofol Dossier prepared for the UNECE Convention on Long-range Transboundary Air Pollution ' s Expert Group on POPs. (2003).
 45. WHO, W. H. O. Dicofol in Drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. *Who WHO/SDE/WS*, WHO/SDE/WSH/05.08/10 (2016).
 46. Adey, J., Hazelden, A., Leather, P. & Carter, R. Methodology and validation results for analyzing pesticides in water by large volume PTV GC-MS / MS. (2017).