



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea magistrale
in Chimica e Tecnologie sostenibili

Tesi di Laurea

Determinazione di traccianti
dell'attività antropica in sedimenti:
messa a punto del metodo

Relatori

Dott. Dario Battistel
Prof. Rossano Piazza

Tesi di Laurea di
Roberta Perin
Matricola 815693

Anno Accademico
2013/2014

Ai miei genitori

INDICE

Indice	2
1. Introduzione	4
2. Scopo	15
3. Parte sperimentale	16
3.1 Materiali e reagenti	16
3.1.1 Operazioni preliminari	18
3.2 Strumentazione	20
3.2.1 Carotiere	20
3.2.2 <i>Pressurized liquid extraction</i> (PLE)	21
3.2.3 <i>Solid-phase extraction</i> (SPE)	22
3.2.4 <i>Power prep</i> ™	23
3.2.5 <i>Turbovap</i> ® II	24
3.2.6 Termoblocco	25
3.2.7 Gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (HRGC-LRMS)	25
3.3 Quantificazione	27
3.3.1 Calcolo della precisione	30
3.3.2 Calcolo della accuratezza	30
3.3.3 Calcolo dei limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ)	31
3.4 Campioni	32
4. Indagini preliminari	34
4.1 Spettrometria di massa	34
4.2 Metodo cromatografico	40
4.3 Derivatizzazione	46
7.1.1. Variabilità della derivatizzazione del tempo	47

7.1.2.	Riproducibilità del processo di derivatizzazione	48
7.1.3.	Valutazione dello stato della colonna cromatografica	51
4.4	Riduzione del volume mediante <i>Turbovap</i> ® II	54
4.4.1	Riduzione del volume a 100 µl	54
4.4.2	Riduzione del volume a secco	57
4.5	Ottimizzazione della procedura di purificazione	60
4.5.1	Purificazione tramite <i>Power Prep</i> ™	60
4.5.2	Purificazione tramite pipetta <i>Pasteur</i> e gel di silice	62
4.5.3	Purificazione via SPE con cartuccia con silice neutra (1g, 6 ml)	70
4.5.4	Purificazione via SPE con cartuccia con silice neutra (2g, 12 ml)	75
4.6	Ottimizzazione della fase di estrazione	80
5.	Metodo analitico: valutazione delle <i>performances</i> analitiche e validazione	83
5.1	Determinazione linearità	84
5.2	Calcolo dei limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) strumentali	85
5.3.	Determinazione dei bianchi procedurali	86
5.4.	Validazione del metodo	87
5.4.1	Determinazione della precisione della accuratezza del metodo	87
5.4.1.1	Applicazione del metodo su una soluzione di riferimento	87
5.4.1.2	Applicazione del metodo su un sedimento certificato	89
5.4.1.3	Applicazione del metodo su un sedimento fluviale	92
6.	Risultati e discussione	95
6.1	Applicazione del metodo su campioni di origine fluviale	95
7.	Considerazioni conclusive	101
	Materiale supplementare	103
	Bibliografia	110

1. INTRODUZIONE

L'indagine condotta su sedimenti consente di risalire a diverse informazioni di carattere paleoambientale, in quanto questa matrice è un prezioso archivio per ricostruire i cambiamenti ambientali e climatici avvenuti in seguito allo sviluppo agricolo, urbano ed industriale, [1-6]. I mutamenti delle condizioni ambientali, infatti, si ripercuotono sull'ecosistema, i cui cambiamenti si manifestano attraverso l'apporto di materiale organico, adsorbito sulle particelle di sedimento [5]. In particolare, nella materia organica possono essere presenti alcune molecole, dette biomarcatori, che consentono di determinare avvenimenti di carattere ambientale, climatico ed archeologico. Tali molecole sono costituite prevalentemente da lunghe catene di atomi di carbonio ed idrogeno che interagiscono tra loro tramite legami covalenti. La loro origine può essere naturale o antropica e possono essere rilasciate nell'ambiente dall'organismo precursore mentre è in vita o successivamente alla sua morte [7]. Per l'elevata stabilità chimica e la resistenza alla degradazione che li caratterizzano, questi composti sono utilizzati per tracciare processi ambientali avvenuti anche a distanza di migliaia di anni [8]. Ad esempio, la determinazione, lungo il profilo verticale di un sedimento, della concentrazione di alcuni marcatori, quali, ad esempio, *charcoal* e levoglucosano ed i suoi isomeri, può fornire informazioni su incendi avvenuti diversi secoli fa [4].

Tra i vari biomarcatori, hanno assunto sempre maggiore rilevanza due classi di steroidi: gli stanoli e gli steroli, la cui analisi nei sedimenti è stata proposta da D'anjou et al. [2], per stabilire la presenza antropica e come quest'ultima influisca sull'ambiente circostante.

Gli steroli, infatti, sono tra i componenti principali delle cellule degli organismi viventi [9]. Tra questi, alcuni, come il colesterolo, si trovano principalmente nel regno animale, altri, invece, come il sitosterolo, sono presenti soprattutto nelle piante e sono denominati fitosteroli.

Poiché tali molecole sono presenti primariamente nelle feci dell'uomo e degli animali, Leeming [10], analizzando gli steroidi nella materia fecale dei mammiferi a sangue caldo, constatò che la loro distribuzione è strettamente legata ad alcuni specifici fattori, tra i quali la dieta. Nelle feci degli animali carnivori e dell'uomo, il 60% degli steroli presenti è costituito da coprostanolo. L'abbondanza di questo composto è, invece, molto più limitata nella materia fecale degli animali erbivori, dove si riscontrano principalmente fitosteroli, come lo stigmastanolo [10].

Un altro fattore che influenza la distribuzione di tali composti è l'attività batterica [10, 11]. I β -stanoli, infatti, vengono prodotti in seguito alla riduzione del colesterolo e di altre molecole congeneri, quali sitosterolo, campestranolo e stigmasterolo, ad opera di batteri. Tale reazione avviene nei tratti dell'intestino dei mammiferi e comporta la bioidrogenazione del composto 5β (H) nel corrispondente stereoisomero 5α (H) [12, 13]. In particolare, studi recenti hanno dimostrato che la trasformazione del colesterolo in coprostanolo riguarda l'ossidazione del gruppo ossidrilico in posizione C-3 e avviene attraverso la formazione di specie intermedie, come mostrato in *Figura 1.1*.

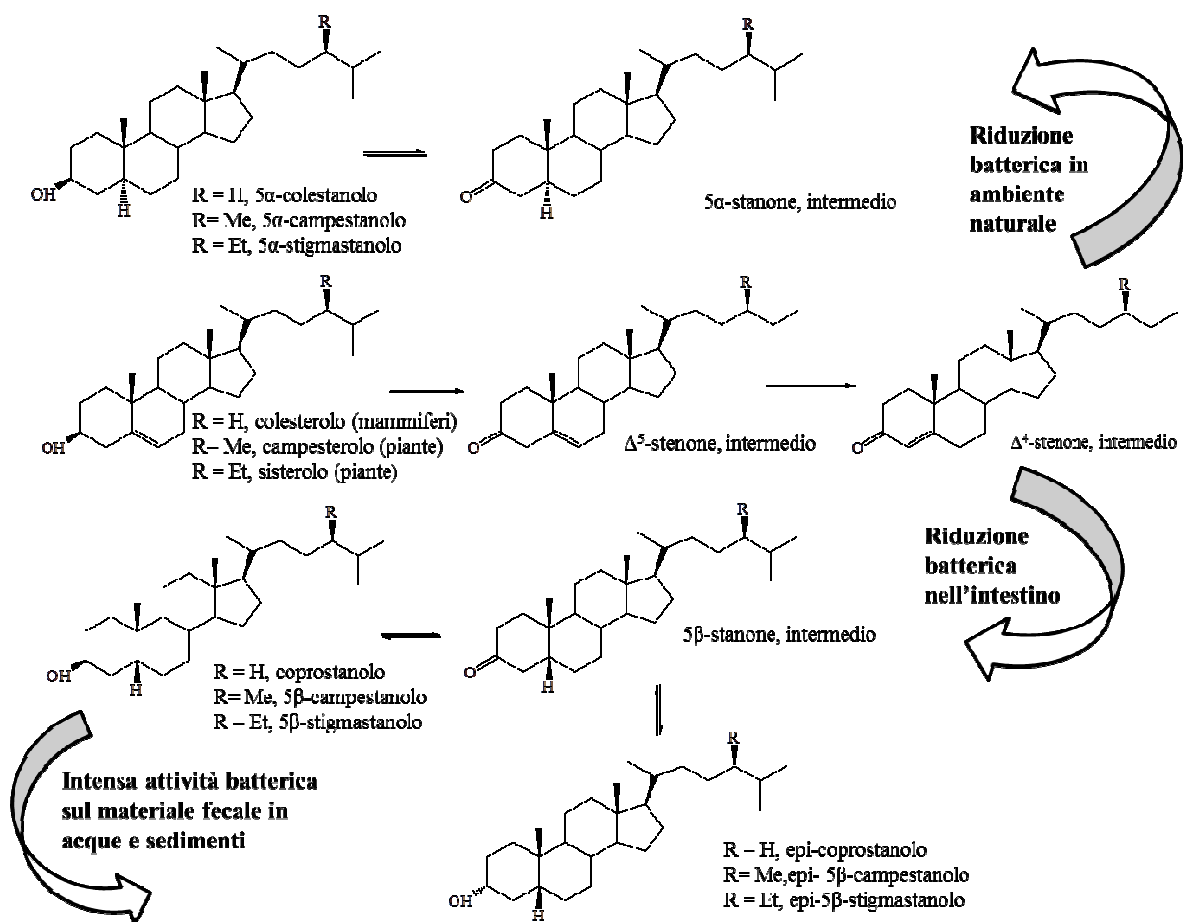


Figura 1.1.: reazioni che interessano gli steroli e gli stanoli nell'ambiente e nell'intestino dei mammiferi [20].

Il processo di degradazione che riguarda gli steroli e gli stanoli avviene grazie alla presenza di microorganismi presenti nel sedimento ed è favorito da condizioni anaerobiche [6, 9, 14, 15]. La velocità di questi processi, infatti, decresce notevolmente all'aumentare della profondità. La natura idrofobica delle molecole, inoltre, favorisce il loro adsorbimento al particolato che si deposita in seguito al processo di sedimentazione, consentendo, in questo modo, lo studio di questi composti anche in

ambito archeologico [16]. Ad esempio, la determinazione nei sedimenti degli steroli, associata all'analisi elementare di specie inorganiche, ha consentito di risalire, almeno parzialmente, all'organizzazione spaziale delle abitazioni di un villaggio risalente all'Età del Ferro, situato a Lejre, in Danimarca [17].

Tali composti hanno assunto un ruolo fondamentale anche nel monitoraggio dell'inquinamento antropico e animale dell'ambiente. La materia fecale, che può essere riversata nell'ambiente da fognature domestiche o da allevamenti di animali, è una delle principali cause della contaminazione di sedimenti e di acque lacustri, fluviali e marine. È noto, che il sedimento costituisce un'efficiente "trappola" per i composti idrofobici, come gli steroidi, che si adsorbono alla matrice e vengono trasportati lontano dal luogo in cui sono stati riversati, per effetto di moti ondosi e correnti [18]. Il lento rilascio di questi inquinanti da parte del sedimento ha effetti sulla qualità dell'acqua causando l'aumento della concentrazione dei nutrienti, la proliferazione di alghe, la riduzione della biodiversità e l'instabilità dell'ecosistema. Inoltre, le feci non tempestivamente trattate sono fonte di agenti patogeni e virali che, se contratti, possono causare malattie quali salmonella, diarrea, colite ed epatite A [19]. È necessario, pertanto, il monitoraggio di questi steroidi per la salvaguardia dell'ambiente e della salute umana.

In natura, la presenza in tracce di steroli è dovuta anche alla loro sintesi biologica. Ad esempio, il coprostanolo può essere prodotto *in situ* tramite idrogenazione anaerobica o riduzione del colesterolo mediante attività batterica. Di conseguenza, l'elevata concentrazione di questa molecola non rispecchia il reale grado di inquinamento del sito indagato, in quanto una parte di tale composto ha origine biologica. Per ottenere un risultato diagnostico più significativo, si utilizzano degli indicatori, dati dal rapporto tra particolari steroidi, che consentono di determinare la sorgente di contaminazione [20].

Poiché lo stigmastanolo viene generalmente prodotto nell'intestino dei ruminanti tramite la bioidrogenazione del sitosterolo e dello stigmasterolo, l'aumento della sua concentrazione può essere indice di contaminazione ambientale dovuta alla materia fecale di animali erbivori [21, 22]. Un rapporto pari a 0.25 tra la concentrazione di coprostanolo e stigmastanolo permette di ricostruire la presenza dell'uomo e degli animali da pascolo, che possono essere ragionevolmente associati alle attività di allevamento di bestiame.

Nel caso in cui, invece, la concentrazione di coprostanolo fosse maggiore e il valore di questo rapporto compreso tra 1.5 e 5.5, il sedimento analizzato potrebbe essere contaminato da materia fecale di origine antropica e/o suina [6].

Anche il rapporto tra la concentrazione di coprostanolo rispetto a quella del colesterolo consente di valutare la contaminazione da materia fecale ed identificarne la possibile origine inquinante. Valori uguali o maggiori a 0.2 indicano un sedimento contaminato da feci umane o animali [23], mentre un rapporto maggiore di 1 è significativo di inquinamento causato da fognature domestiche [10, 24, 25].

Il grado di contaminazione di un sito può essere determinato anche dal rapporto tra le concentrazioni di coprostanolo ed epi-coprostanolo: valori superiori a 2.5 evidenziano l'incidenza dell'inquinamento antropico [26].

Nella **Tabella 1.1.** sono riportati gli indicatori appena descritti con le rispettive interpretazioni.

Tabella 1.1.: indicatori, presenti in letteratura, dati dal rapporto tra le concentrazioni di alcuni steroli e stanoli.

Indicatore	Origine
	= 0.25, Contaminazione da ruminanti
Coprostanolo : Stigmastanolo	< 0.3, Contributo biologico
	= 1.5 – 5.5, Contaminazione antropica e/o suina
	≥ 0.2, Contaminazione antropica
Coprostanolo : Colesterolo	< 1, Contributo biologico
	> 1, Contaminazione antropica
	< 2.5, Contributo biologico
Coprostanolo : Epi-coprostanolo	> 2.5, Contaminazione antropica

L'eterogeneità del sedimento, dovuta alle differenti proprietà fisiche e alla composizione chimica che lo distinguono, insieme alle caratteristiche del sito di campionamento, comportano un'abbondanza variabile degli steroli e degli stanoli lungo il profilo verticale di sedimento. Ad esempio, Frohner et al. [18], si è occupato dell'analisi dei sedimenti superficiali, campionati in sei diversi siti lungo il fiume Bangü, in Brasile. Le concentrazioni di coprostanolo e di epi-coprostanolo che sono state rilevate mostrano valori compresi tra $0.25 \mu\text{g g}^{-1}$ e $196 \mu\text{g g}^{-1}$ e tra $0.02 \mu\text{g g}^{-1}$ e $9.71 \mu\text{g g}^{-1}$, rispettivamente.

Questi valori, ad esempio, si discostano notevolmente da quelli calcolati nei sedimenti campionati nel mare dell'Antartide, in cui le concentrazioni di coprostanolo e di epi-coprostanolo sono comprese in un *range* di 10 e 150 ng g^{-1} [26]. In base a queste considerazioni, appare chiara la necessità di applicare ai campioni di sedimento un metodo analitico robusto.

Sulla base di queste considerazioni, i principali steroidi eventualmente presenti nei sedimenti atti a monitorare l'inquinamento di un sito e a studiare l'influenza dell'attività antropica sull'ambiente, sono coprostanolo, epi-coprostanolo, colesterolo, stigmastanolo e sitosterolo.

In **Tabella 1.2.** vengono riportati la nomenclatura IUPAC, il nome comune, la classe di appartenenza, il peso molecolare (PM) e la temperatura di ebollizione (T_b), registrata alla pressione di 760 mm Hg, di tali composti.

Tabella1.2.: sono riportati nome IUPAC, nome comune, classe, PM e tempertura di ebollizione di cinque steroidi.

Nome IUPAC	Nome comune	classe	PM (g mol⁻¹)	T_b (°C)
5 β -colestano-3 β -olo	Coprostanolo	Stanoli	388.67	455.3
5 β -colestano-3 α -olo	Epi-coprostanolo	Stanoli	388.67	455.0
Colest-5-en-3 β -olo	Colesterolo	Steroli	386.65	360.0
24 α -etil-5 α -colestano-3 β -olo	Stigmastanolo	Stanoli	416.72	471.9
24-etilcolest-5-en-3 β -olo	Sitosterolo	Steroli	414.71	501.0

Di seguito sono indicate le strutture molecolari dei composti citati nella **Tabella 1.2.**

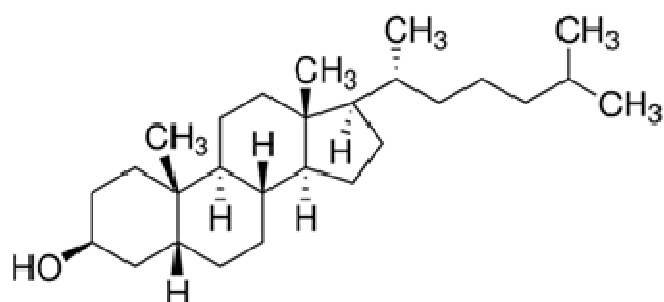


Figura 1.2.A): struttura molecolare del coprostanolo.

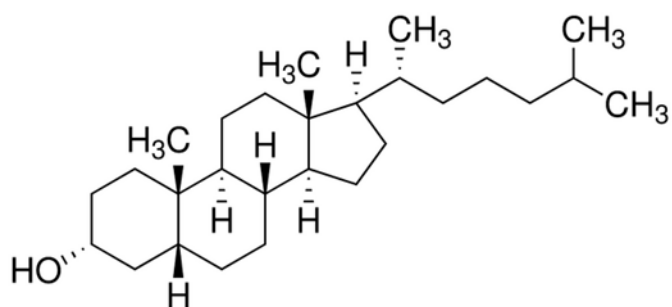


Figura 1.2.B): struttura molecolare dell'epi-coprostanolo.

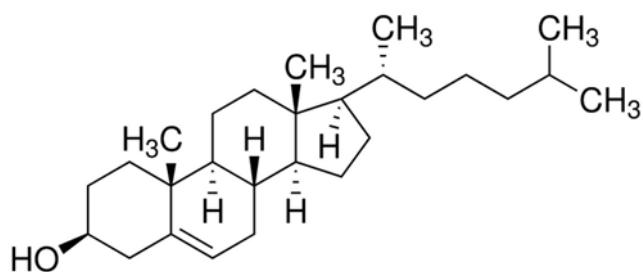


Figura 1.2.C): struttura molecolare del colesterolo

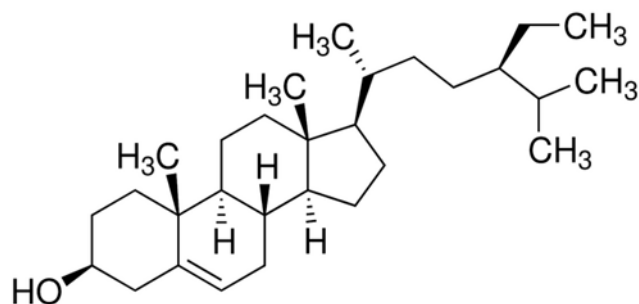


Figura 1.2.D): struttura molecolare del sitosterolo.

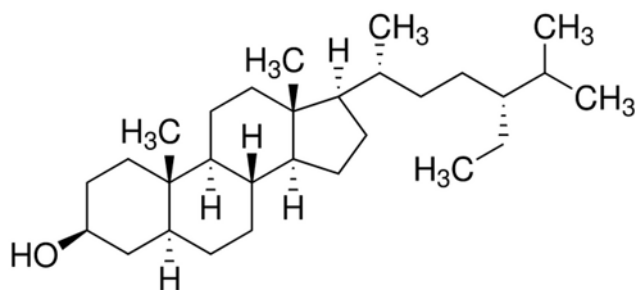


Figura 1.2.E): struttura molecolare dello stigmastanolo.

In letteratura, diversi metodi analitici sono stati sviluppati per monitorare il grado di inquinamento di un particolare sito attraverso lo studio degli steroli fecali nell'acqua, nei sedimenti e nel suolo [16, 27-29].

Per l'estrazione degli analiti dal sedimento vengono usate differenti procedure e strumentazioni, tra cui il sistema di estrazione accelerata con solvente, l'estrattore Soxhlet e il bagno ad ultrasuoni, con solventi come etanolo, metanolo, le miscele

diclorometano/metanolo e diclorometano/esano [11, 16, 26]. Alla purificazione dell'estratto, effettuata con colonne in silice multifasica o allumina disattivata, segue l'analisi strumentale eseguita principalmente con il gascromatografo accoppiato allo spettrometro di massa (GC-MS) o con il gascromatografo dotato di rivelatore ad ionizzazione di fiamma (GC-FID) [19, 26, 30].

Per la quantificazione e il recupero degli steroidi è generalmente utilizzato il metodo dello standard interno [20, 31]. A questo scopo, da un lato vengono utilizzati standard deuterati, come il colesterolo-2,2,3,4,4,6-d₆ [19], e il 17- β -estradiolo-2,4,16,16-d₄ [6], dall'altro, sono impiegati composti nativi che non sono presenti nel campione, come 5- α -androstan-3 β -olo [18, 32], 5- β -pregnan-3-olo [16, 33], 5- α -colestano [34], 5- α -colestano-3 β -olo [6].

La scelta dello standard interno richiede attente valutazioni. In particolare, l'utilizzo di composti nativi implica ulteriori analisi, come nel caso dell'impiego di 5- α -colestano-3 β -olo come standard interno, che può essere anche prodotto *in situ* dal colesterolo attraverso l'azione batterica [6]. L'impiego di standard deuterati, d'altra parte, non è sempre consigliabile per la quantificazione degli analiti. Nonostante gli steroidi non presentino gruppi aromatici o carbonilici, infatti, Kwok et al. (2008) [35] hanno osservato l'occorrenza di uno scambio idrogeno-deuterio anche in alcuni steroli.

2. SCOPO

Lo scopo di questa tesi è stato quello di sviluppare un metodo analitico per eseguire analisi qualitative e quantitative di cinque steroidi presenti nel sedimento: coprostanolo, epi-coprostanolo, colesterolo, sitosterolo e stigmastanolo in campioni di sedimento.

Infatti, come è stato evidenziato nel capitolo introduttivo, lo studio di queste molecole riveste un ruolo importante in ambito paleoclimatico, ambientale e archeologico, dato che si trovano nella materia fecale e possono essere impiegati come traccianti dell'attività antropica sia nel presente che nel passato.

Il lavoro di questa tesi si articola in una descrizione dello sviluppo e dell'ottimizzazione del metodo analitico, nelle diverse fasi della metodica. Va osservato che allo scopo di superare le criticità emerse in diversi studi presenti in letteratura e legate alla scelta di composti deuterati o nativi come standard interno, in questa tesi è stato utilizzato come standard interno il colesterolo marcato isotopicamente ^{13}C . Successivamente, il metodo è stato validato e ne sono state determinate le *performances* analitiche in termini di linearità, limiti di rivelabilità e quantificazioni strumentali e bianchi procedurali.

Il metodo è stato inoltre testato in un contesto ambientale, in cui vengono monitorati gli steroidi indagati in campioni di sedimento prelevati in prossimità di un sito potenzialmente inquinato presso il fiume Piave. Lo scopo è quello di ottenere informazioni sul grado di inquinamento riscontrato nel luogo di campionamento e sulla origine della contaminazione.

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1 Materiali e reagenti

I solventi impiegati, diclorometano (DCM), n-esano, metanolo (MeOH), acetone e acido cloridrico (HCl, 33%), con grado di purezza pesticidi, sono stati acquistati da *Romil Ltd.*, Cambridge, GB.

Sono stati utilizzati sia standard dei composti nativi, ovvero 5 β -coleston-3 β -olo (coprostanolo), 5 β -coleston-3 α -olo (epi-coprostanolo), 24 α -etil-5 α -coleston-3 β -olo (stigmastanolo) e 24-etilcolest-5-en-3 β -olo (sitosterolo), sia standard marcati: colest-5-en-3 β -olo-25,26,27-¹³C₃ (colesterolo-25,26,27-¹³C₃) e colest-5-en-3 β -olo-3,4-¹³C₂ (colesterolo-3,4-¹³C₂). In questa trattazione gli standard sopra citati verranno indicati rispettivamente con le abbreviazioni riportate nella **Tabella 3.1**.

Tabella 3.1.: standard nativi e marcati che sono stati impiegati e abbreviazioni corrispondenti.

Nome dello standard	Abbreviazione
Coprostanolo	COP
Epi-coprostanolo	e-COP
Stigmastanolo	STIGMA
Sitosterolo	SITO
Colesterolo-25,26,27- ¹³ C ₃	COL 25-26-27
Colesterolo-3,4- ¹³ C ₂	COL 3-4

Come derivatizzante è stata utilizzata la miscela composta da N,O-Bis (trimetilsili) trifluoroacetammide e da trimetilclorosilano (BSTFA + 1% TMC), alla quale si farà riferimento in seguito con l'abbreviazione BSTFA.

La *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, MO, USA) ha fornito i reagenti descritti, con un grado di purezza compreso tra 85 e 99 %, il rame metallico in polvere, Cu (0), e il solfato di sodio, Na₂SO₄, con i quali è stato trattato l'estratto.

La terra di diatomee e la sabbia di Ottawa, impiegate per l'estrazione con PLE, sono state fornite da *Applied Separation Inc.* (Allentown, PA, USA)

La purificazione, eseguita tramite pipetta *Pasteur*, ha previsto l'utilizzo di Gel di Silice (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, MO, USA) come fase stazionaria.

La procedura di purificazione via SPE è stata condotta con cartucce monouso acquistate presso *Discovery*® con modello: DCS-Si SPE, 52657. Tali cartucce presentano 1 e 2 g di silice neutra come fase stazionaria, e possono contenere fino a 6 e 12 ml di fase mobile, rispettivamente.

Le cartucce in teflon con silice neutra come fase stazionaria, utilizzate per la purificazione tramite *Power Prep*, sono una produzione *Fluid Management System Inc.* (Watertown, MA, USA).

Molte analisi descritte in seguito sono state eseguite impiegando una soluzione madre a concentrazione di 10 ng/μL, realizzata con gli standard di coprostanolo, epi-coprostanolo, stigmastanolo, sitosterolo, colesterolo-25,26,27-¹³C₃ e colesterolo-3,4-¹³C₂. Durante la trattazione questa soluzione verrà indicata come *soluzione standard*.

3.1.1 Operazioni preliminari

La vetreria è lavata con acqua e detergente Contrad®, asciugata con acetone e decontaminata con tre aliquote di DCM e n-esano, rispettivamente. La medesima procedura di decontaminazione è eseguita anche sul materiale monouso, come *vial* e pipette *Pasteur*.

Prima di ogni prova, la *vessel* in acciaio inossidabile, utilizzata nell'estrazione con PLE, viene lavata con due aliquote di DCM e n-esano in bagno ad ultrasuoni per 5 minuti. I tappi in gomma sono decontaminati con 4 lavaggi in n-esano per 5 minuti nel bagno ad ultrasuoni.

La decontaminazione della sabbia di Ottawa e della terra di diatomee, impiegate nella procedura estrattiva, prevede due cicli estrattivi con miscela DCM : MeOH = 9:1 (v/v) e impostando temperatura e pressione a 100°C e 2300 psi, rispettivamente. Con gli stessi parametri e solventi è eseguita la pulizia delle linee dello strumento.

Prima di ogni purificazione, i dadi e la siringa del *Power Prep*TM sono sottoposti a due lavaggi in n-esano in bagno ad ultrasuoni per 5 minuti, mentre sono impiegati 50 mL della miscela n-esano : DCM = 1: 1 (v/v) per la pulizia dello strumento, le cui linee sono condizionate con n-esano.

Il cotone utilizzato per la purificazione con la pipetta *Pasteur* è decontaminato con tre aliquote di DCM in bagno ad ultrasuoni.

In accordo con metodo US-EPA 3660B, l'estratto è stato trattato con rame metallico allo scopo di rimuovere lo zolfo dal sedimento che potrebbe interferire con le misure.

La procedura di attivazione del rame consiste nel trattare 50 g di Cu (0) solido con HCl, seguito da lavaggi con diversi solventi quali acqua milli-Q, acetone ed esano e con cicli di ultrasuoni della durata di 15 minuti. Per eliminare gli ossidi presenti sulla superficie del rame vengono effettuati tre lavaggi con ognuno dei solventi sopra indicati, di cui si impiega un volume tale da ricoprire il Cu(0).

Il rame attivato viene conservato in esano, precedentemente trattato con azoto in un bagno a 37°C per eliminare l'ossigeno.

L'anidificazione dell'estratto è stata eseguita con Na₂SO₄, posto, prima dell'utilizzo, per 4 ore in muffola alla temperatura di 400 °C, decontaminato con lavaggi in DCM : MeOH (9:1, v/v) e conservato in n-esano.

3.2 Strumentazione

3.2.1 Carotiere

Il campionamento del sedimento è stato condotto con un carotiere, impiegato solitamente per indagare la stratigrafia e il profilo verticale del suolo. Lo strumento è costituito da un'asta di forma cilindrica che consente di imprimere l'energia necessaria per far penetrare un tubo in acciaio inox negli strati sedimentari. La carota di sedimento viene raccolta nel *liner*, un cilindro in *plexiglass* con, nell'estremità inferiore, una componente denominata naso, dotata di un dispositivo di chiusura a lamelle, la corona, che trattiene la carota all'interno del *liner*, durante la fase estrattiva e di risalita.

Il funzionamento, molto semplice, prevede l'immersione del carotiere in acqua fino al raggiungimento del suolo, in cui si fa penetrare lo strumento che raccoglie la carota di sedimento di forma cilindrica. Dopo la risalita e l'emersione dall'acqua, il campione viene rilasciato facendo pressione sull'asta.

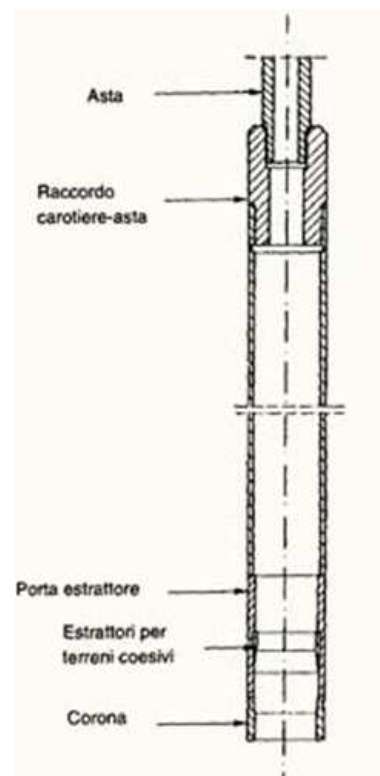


Figura 3.1.: schematizzazione della struttura del carotiere, con riferimento alle sue componenti principali.

3.2.2 Pressurized Liquid Extraction (PLE)

Con questo strumento, attraverso l'utilizzo di piccoli volumi di solvente e in tempi brevi, è possibile effettuare estrazioni efficienti e riproducibili.

Il processo avviene grazie agli elevati valori di temperatura e di pressione ai quali è possibile impostare lo strumento. L'alta temperatura rende il campione più solubile e garantisce una maggiore diffusione del solvente, mentre l'alta pressione ne impedisce l'evaporazione. Con queste condizioni operative, l'estrazione degli analiti dal campione solido si rivela più efficace.

Il sedimento, insieme alla sabbia di Ottawa e alla terra di diatomee, è introdotto in un supporto cilindrico in acciaio inossidabile (*vessel*), che viene chiuso con dei tappi muniti di guarnizione di gomma e posto nello spazio apposito dello strumento. Durante il ciclo estrattivo, il solvente, attraversando le linee del PLE, entra nella *vessel* ed interagisce con il campione. L'estrazione viene condotta in condizioni di temperatura e pressione controllate. Alla fine di ogni ciclo, il solvente viene raccolto in un apposito contenitore. Un ultimo passaggio viene eseguito facendo fluire N₂ per evitare la contaminazione nel caso di analisi successive e per raccogliere l'eventuale solvente rimasto nelle linee.



Figura 3.2.: Pressurized liquid extraction (PLE).

3.2.3 Solid-Phase Extraction (SPE)

L'estrazione in fase solida con solvente (SUPELCO, VISIPREP™ DL) è una tecnica preparativa del campione, precedentemente estratto, che consente la separazione di analiti aventi differente natura chimica. Il processo di purificazione avviene grazie all'interazione tra l'estratto, eluito nella cartuccia dalla fase mobile, e la fase stazionaria, che può essere silice, allumina, fluorisil o resine, a seconda della natura del campione da trattare. Le diverse componenti di quest'ultimo, dunque, possono essere trattenute o fluire lungo il letto della colonna, a seconda della scelta di appropriata fase mobile e stazionaria. La maggiore precisione e accuratezza dell'analisi sono raggiunte attraverso l'aumento della concentrazione delle molecole monitorate, grazie l'eluizione dell'estratto con piccoli volumi di solvente. Altri vantaggi che possono derivare dall'utilizzo di questa strumentazione sono la minore esposizione ad agenti tossici e perdita dei campioni, l'evaporazione minima del solvente e i pochi *steps* operativi costituenti la procedura.



Figura 3.3: strumentazione adottata per la solid-phase extraction (SPE).

3.2.4 Power Prep™

Il *Power Prep™* (FMS, Fluid Management System Inc., Waltham, MA, USA) è un sistema basato sulla cromatografia che consente la purificazione e il frazionamento dell'estratto. Lo strumento, i cui parametri vengono impostati e controllati tramite un software installato su PC, opera autonomamente ed automaticamente, gestendo le varie fasi del processo, compresi il lavaggio, l'iniezione e la raccolta delle varie frazioni purificate.

Il solvente impiegato per la purificazione, grazie a un sistema di pompaggio costituito da valvole, fluisce attraverso tubi in teflon e raggiunge la colonna cromatografica in cui è contenuto l'estratto. Le cartucce monouso preimpaccate della colonna contengono la fase stazionaria che può essere costituita da diversi materiali quali allumina, carbone, silice neutra o multistrato (acida-basica-neutra).



Figura 3.4.: Power Prep™.

3.2.5 Turbovap® II

Il *Turbovap® II* (*Caliper Life Science*, Hopkinton, MA, USA), è uno strumento che consente l'evaporazione controllata del solvente attraverso un flusso di azoto.

Gli estratti vengono trasferiti in ditali di vetro (*Zyrmark®*) dal volume di 200 mL e collocati nelle sei postazioni disponibili, ognuna delle quali prevede l'immersione del ditale in un bagno ad acqua e dotata di un ugello da cui viene erogato l'azoto. Il raggiungimento del volume finale di 500 µL viene segnalato da un sensore ottico con successiva interruzione dell'erogazione di N₂. Il pannello di controllo presente sullo

strumento permette di selezionare la temperatura del bagno ad acqua, la pressione del gas, la postazione di lavoro e la modalità di concentrazione manuale, da impostare qualora sia necessario ridurre il solvente a volumi inferiori a 500 µL.



Figura 3.5.: evaporatore automatico Turbovap® II.

3.2.6 Termoblocco

Il Termoblocco (*FALC INSTRUMENTS*, BG, ITALIA) è un dispositivo riscaldante a secco dotato di blocchi intercambiabili, in cui possono essere collocate *vial* di diversa grandezza grazie alla presenza di cavità circolari di vari diametri. La distribuzione uniforme del calore è assicurata dalle vaschette di contenimento realizzate in alluminio.



Figura 3.6.: Termoblocco.

3.2.7 Gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (HRGC-LRMS)

Gli steroidi in esame sono analizzati con uno strumento ifenato, costituito da un gascromatografo (*Agilent Technologies 7890 GC System*) accoppiato a uno spettrometro di massa, dotato di quadrupolo come analizzatore (*Agilent Technologies 5975C inert MSD*). Dopo la vaporizzazione nel *liner*, per mezzo di un flusso di elio, gli analiti

attraversano la colonna capillare in silice fusa della lunghezza di 60 m e costituita da (5%-fenil)-metilpolisilossano, come fase stazionaria (*Agilent Technologies*, 0.250 mm • 0.25 µm), con cui le molecole del campione interagiscono, con conseguente separazione degli analiti. La ionizzazione avviene in seguito all'urto con un fascio di elettroni accelerati prodotti dalla sorgente ad impatto elettronico (*EI*), di cui è dotato lo spettrometro di massa. In seguito, solamente gli ioni carichi positivamente, caratterizzati da uno specifico rapporto massa/carica (m/z), vengono analizzati dal quadrupolo e registrati da un software specifico.

Si rimanda in Materiale Supplementare i dettagli relativi alle condizioni sperimentali di utilizzo.



Figura 3.7.: sistema HRGC-LRMS.

3.3 Quantificazione

La determinazione quantitativa delle molecole è eseguita con il metodo dello standard interno, attraverso cui è possibile ridurre la variabilità di alcuni fattori che influenzano la misura analitica. Le cause dell'incertezza del risultato possono essere di natura chimico-fisica o sperimentale, legate, ad esempio, al cambiamento di temperatura, all'interazione con la matrice, all'imprecisione nel prelevare un certo volume di soluzione o alla irriproducibilità delle operazioni di iniezione nello strumento. Risultati più accurati ed affidabili si ottengono impiegando il metodo dello standard interno: analita di riferimento le cui caratteristiche chimico-fisiche e struttura molecolare devono essere confrontabili con quelle dei composti che si stanno analizzando. Lo standard interno, inoltre, deve essere stabile termicamente, separabile dall'analita e dagli altri componenti, non presente nel campione con cui non deve reagire o interferire, deve fornire un picco cromatografico ben risolto da quello degli altri analiti e avere un tempo di ritenzione simile a quello dei composti da determinare.

La procedura del metodo dello standard interno ha comportato l'analisi della *soluzione standard* (pag.17) al gascromatografo nelle stesse condizioni sperimentali applicate ai campioni reali. Integrando le aree dei picchi degli analiti, di cui è nota la concentrazione, è stato possibile calcolare il fattore di risposta di ciascuno, con la seguente formula:

$$FR_i = (A_{in} \cdot C_m) / (A_m \cdot C_{in})$$

Dove:

FR_i = fattore di risposta dell'analita i-esimo;

A_{in} = area del picco dello standard della specie nativa;

C_m = concentrazione dello standard marcato;

A_m = area del picco dello standard marcato;

C_{in} = concentrazione dello standard della specie nativa.

La quantificazione dei composti viene ottenuta utilizzando l'espressione indicata di seguito, in cui si rapporta l'area del picco di ogni analita rispetto a quella dello standard interno marcato ^{13}C , aggiunto in quantità e concentrazioni note nel campione all'inizio della procedura, e il fattore di risposta della molecola esaminata.

$$C_i = (A_i \cdot Q_M) / (A_M \cdot FR_i)$$

Dove:

C_i = concentrazione dell'analita in esame;

A_i = area del picco dell'analita in esame;

Q_M = quantità assoluta dello standard interno;

A_M = area del picco dello standard interno;

FR_i = fattore di risposta dell'analita in esame.

Assumendo che lo standard interno e i composti indagati abbiano lo stesso comportamento chimico-fisico, che subiscano gli stessi processi, che interagiscano allo

stesso modo con la matrice, i solventi e tutti i materiali con cui il campione viene a contatto, allora, se avviene la perdita dell'analita durante la procedura metodologica, si deve verificare una perdita anche dello standard interno. È possibile risalire alla concentrazione iniziale e stimare la perdita dei composti, aggiungendo, alla fine della procedura preanalitica, in concentrazione nota, lo standard di recupero: una molecola che non deve avere necessariamente struttura e caratteristiche chimico-fisiche simili all'analita. Dal confronto tra lo standard interno e lo standard di recupero è possibile calcolare l'efficienza di recupero, R %, secondo la formula:

$$R \% = (A_M \cdot Q_R \cdot 100) / (Q_M \cdot A_R \cdot F_{MR})$$

Dove:

A_M = area del picco dello standard interno;

Q_R = quantità assoluta dello standard di recupero, aggiunto alla fine della procedura di preanalitica;

Q_M = quantità assoluta dello standard interno;

A_R = area del picco dello standard di recupero;

F_{MR} = fattore di risposta calcolato per lo standard interno facendo riferimento allo standard di recupero.

3.3.1 Calcolo della precisione

La precisione è definita come il grado di concordanza tra diverse misurazioni di un campione eseguite con la stessa procedura. Tale parametro è indice anche della ripetibilità del metodo analitico e viene espresso in termini di coefficiente di variazione percentuale, CV, ossia:

$$CV = (s / \bar{x}) \times 100$$

Dove:

s = deviazione standard relativa;

\bar{x} = media dell'insieme dei dati.

3.3.2 Calcolo della accuratezza

L'accuratezza, in termini di recupero apparente, esprime il grado di concordanza tra il valore misurato e il valore vero e può essere calcolata con la seguente espressione:

$$E \% = [(X_i - X_t) / X_t] \times 100$$

Dove:

X_i = valore misurato;

X_t = valore vero.

3.3.3 Calcolo dei limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ)

Il limite di rivelabilità e di quantificazione indicano, rispettivamente, la concentrazione di analita corrispondente al segnale minimo significativo e il valore minimo che lo strumento può rilevare per effettuare una misurazione quantitativa.

Utilizzando le formule riportate di seguito sono stati calcolati i due parametri, a cui si è potuto risalire impiegando i valori dell'intercetta e della pendenza ricavate dalla retta di calibrazione.

$$\text{LOD} = (\text{Intercetta} \cdot 3) / \text{Pendenza}$$

$$\text{LOQ} = (\text{Intercetta} \cdot 10) / \text{Pendenza}$$

3.4 Campioni

Il metodo analitico sviluppato è stato applicato a dei sedimenti che si differenziano per origine e caratteristiche fisiche e chimico-fisiche, in quanto prelevati in diversi siti geografici.

Il primo campione, una carota di lunghezza 30 cm, presenta granulometria sottile e piuttosto omogenea, ed è stato raccolto in prossimità di uno scarico domestico in località Spinea.

Il secondo sedimento, di origine fluviale, risulta meno compatto, con granulometria più fine e composizione principalmente sabbiosa. Il campionamento è stato eseguito in tre siti lungo il fiume Piave nelle vicinanze di Noventa: il SITO A in prossimità di un sito potenzialmente contaminato, il SITO B 3 m a valle e il SITO C circa 3.5 km a monte, dello stesso.

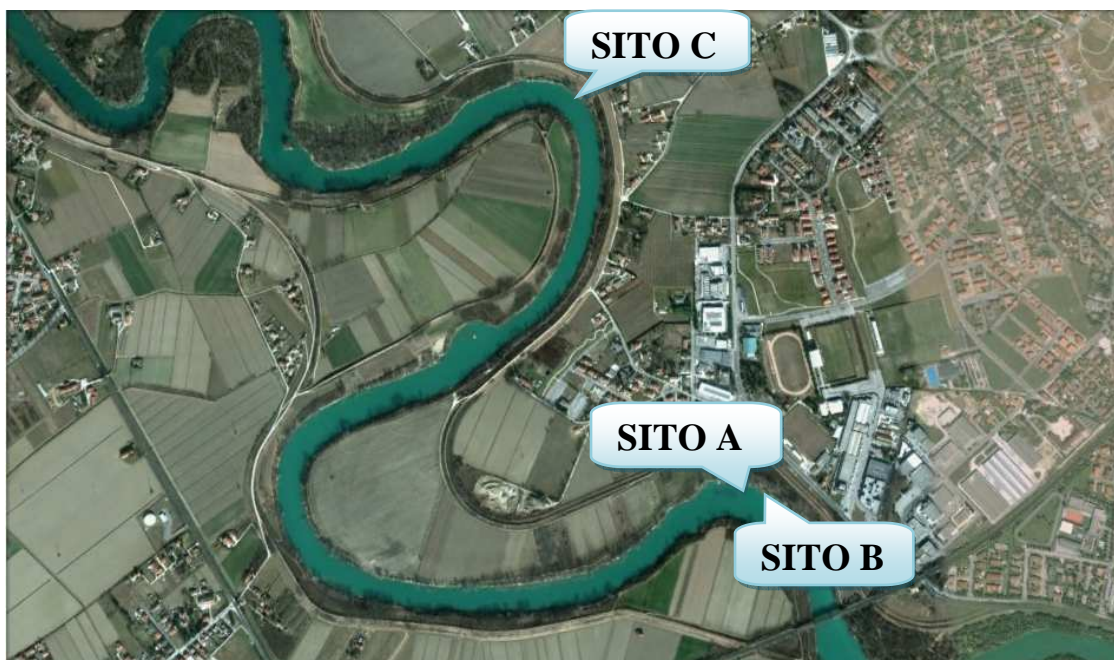


Figura 3.8.: sito di campionamento in prossimità di Noventa di Piave.

La procedura preparativa ha previsto una prima fase di essiccamento dei campioni che sono stati collocati in stufa, impostata alla temperatura di 40°C, fino al raggiungimento di un peso costante.

Una volta essiccati, i sedimenti sono stati frantumati, macinati e setacciati, per diminuire la dimensione delle particelle, da mantenersi omogenea per non alterare la composizione del campione. In un mortaio d'agata, una piccola quantità di sedimento viene macinata finché le sue particelle non assumono dimensioni tali da attraversare la maglia in rete metallica di cui è costituito il setaccio.

Dopo le operazioni di macinazione e setacciamento, i campioni sono stati conservati in appositi contenitori impermeabili all'umidità.

4. INDAGINI PRELIMINARI

4.1. Spettrometria di massa

Preliminarmente, viene acquisito lo spettro di massa di ogni composto studiato. Negli spettri di massa sono riportate le abbondanze degli ioni frammentati in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z). Tali *pattern* di frammentazione sono caratteristici di ogni molecola studiata.

A tale scopo, le soluzioni di ogni standard, alla concentrazione di 10 ng/ μ L, sono state derivatizzate secondo la procedura discussa in seguito, ed analizzate al GC-MS, impostato in modalità *fullscan*. In particolare, tali spettri sono stati ottenuti acquisendo il segnale relativo ad ogni ione, in un *range* m/z compreso tra 50 e 550.

Nella *Figura 4.1.A*) e seguenti sono riportati gli spettri di massa, registrati impiegando le condizioni cromatografiche indicate nella sezione Materiale Supplementare.

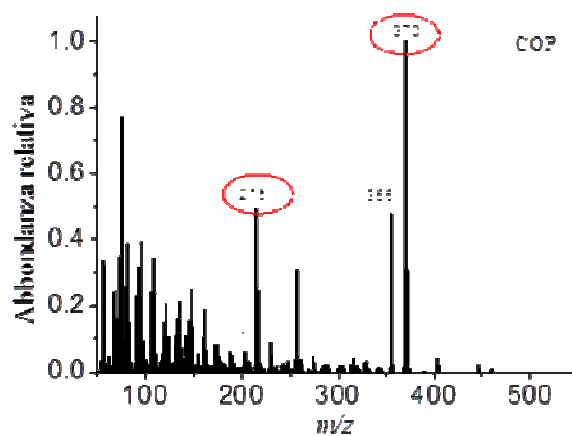


Figura 4.1.A): spettro di massa del coprostanolo siliizzato.

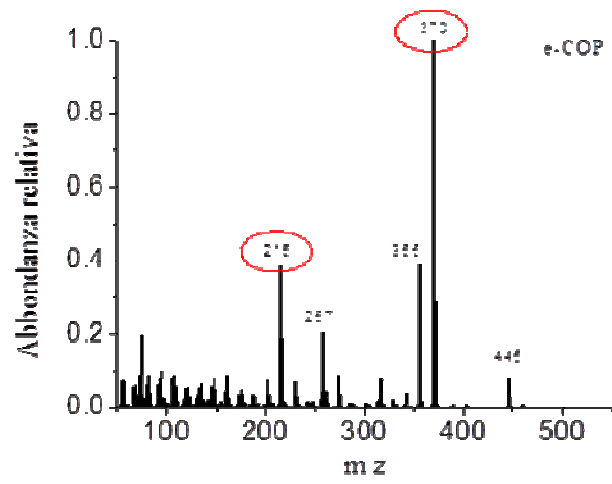


Figura 4.1.B): spettro di massa dell'epi-coprostanolo sililizzato.

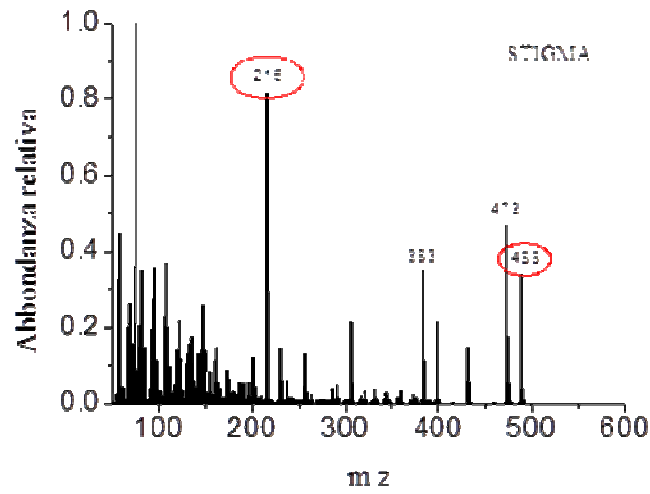


Figura 4.1.C): spettro di massa dello stigmastanolo sililizzato.

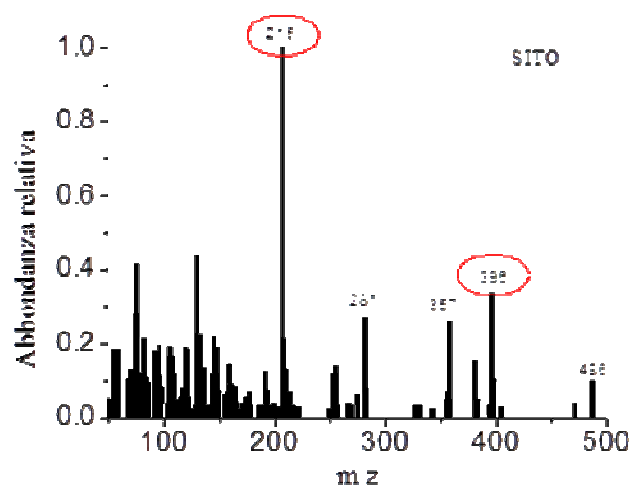


Figura 4.1.D): spettro di massa del sitosterolo sililizzato.

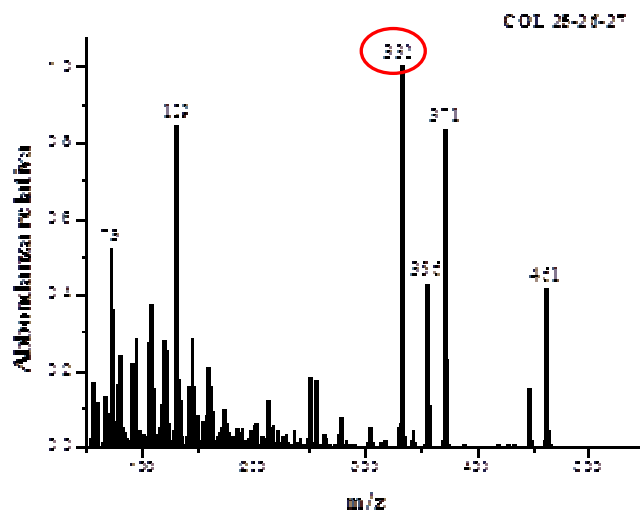


Figura 4.1.E): spettro di massa del colesterolo-25,26,27-¹³C₃ sililizzato.

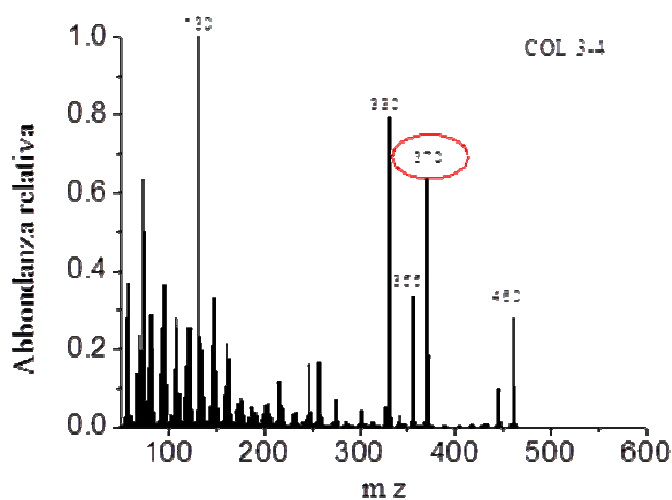


Figura 4.1 F): spettro di massa del colesterolo-3,4-¹³C₂ silylizzato.

Negli spettri di massa sopra indicati, sono evidenziati gli ioni che sono stati successivamente individuati per la determinazione qualitativa e quantitativa dei composti presi in esame. Tale scelta è stata effettuata considerando i frammenti che presentavano maggiore intensità e che erano caratterizzati da una possibile minore interferenza dovuta da altri composti che presentano una simile frammentazione.

In **Tabella 4.1**, sono riassunti gli ioni scelti per ogni analita e il rapporto tra le aree dello ione qualificatore e dello ione target, di cui è stata calcolata loro variabilità espressa dal coefficiente di variazione percentuale (CV) che presenta valori compresi tra il 3.8% e il 6.0%. I risultati ottenuti da tale rapporto saranno confrontati con quelli misurati nel campione reale, per verificarne la corrispondenza.

Tabella 4.1.: riassunto degli ioni target e qualificatore scelti per ciascun analita e rapporto Q/T. Tra parentesi i corrispondenti CV.

Analita	Ione target, T (m/z)	Ione qualificatore, Q (m/z)	Q/T
COP	215	370	1.694 (3.8%)
e-COP	215	370	0.752 (6.0 %)
SITO	215	396	5.464 (3.2 %)
STIGMA	215	488	0.179 (4.6 %)
COL	368	-	-
COL 3-4	370	-	-
COL 25-26-27	332	-	-

Non disponendo dello standard del colesterolo nativo (COL), è stato cercato in letteratura lo spettro di massa del composto, il cui *pattern* presenta maggiore intensità in corrispondenza del frammento caratterizzato da rapporto m/z pari a 368. È stato inoltre ragionevolmente assunto che tale ione coincida con quelli aventi m/z pari a 370 e 371, presenti negli spettri di massa del COL 3-4 e COL 25-26-27, rispettivamente. Per la quantificazione del colesterolo nativo, dunque, è stato assunto che in questo caso il valore del fattore di risposta fosse uguale a 1.

Impurezze

Va osservato che, pur iniettando nel gascromatografo una soluzione dello standard di stigmastanolo, il cromatogramma registrava la presenza di due picchi. Le condizioni cromatografiche impiegate e il cromatogramma sono riportati nella sezione Materiale Supplementare.

Utilizzando le librerie di cui è dotato il *software* dello strumento e facendo un confronto con il cromatogramma e lo spettro di massa dello stigmastanolo acquisiti in precedenza, è stato possibile identificare il secondo picco, che risulta corrispondere al sitosterolo.

Per correggere quindi la concentrazione dei due analiti, sono state analizzate al GC-MS due soluzioni, una costituita dal colesterolo-25,26,27-¹³C₃, quale standard interno, e sitosterolo, l'altra, invece, dallo standard interno e dal stigmastanolo, presenti in concentrazione nota. Rapportando le aree del sitosterolo e del colesterolo, ricavate dall'integrazione dei picchi del cromatogramma della prima soluzione, e le concentrazioni note dei due standard, è stato possibile calcolare la percentuale di sitosterolo presente nella soluzione standard di stigmastanolo che è pari al 6%.

Durante questa trattazione, il fattore di risposta di entrambi gli analiti verrà corretto per il valore della concentrazione così determinato.

4.2. Metodo cromatografico

Allo scopo di separare cromatograficamente gli steroidi considerati, la *soluzione standard*, alla concentrazione di 2 ng/ μ L, è stata inizialmente analizzata al GC-MS, impiegando le condizioni operative indicate nella sezione Materiale Supplementare e impostate sulla base delle indicazioni riportate in letteratura [29]. La **Figura 4.2.** mostra il cromatogramma così ottenuto.

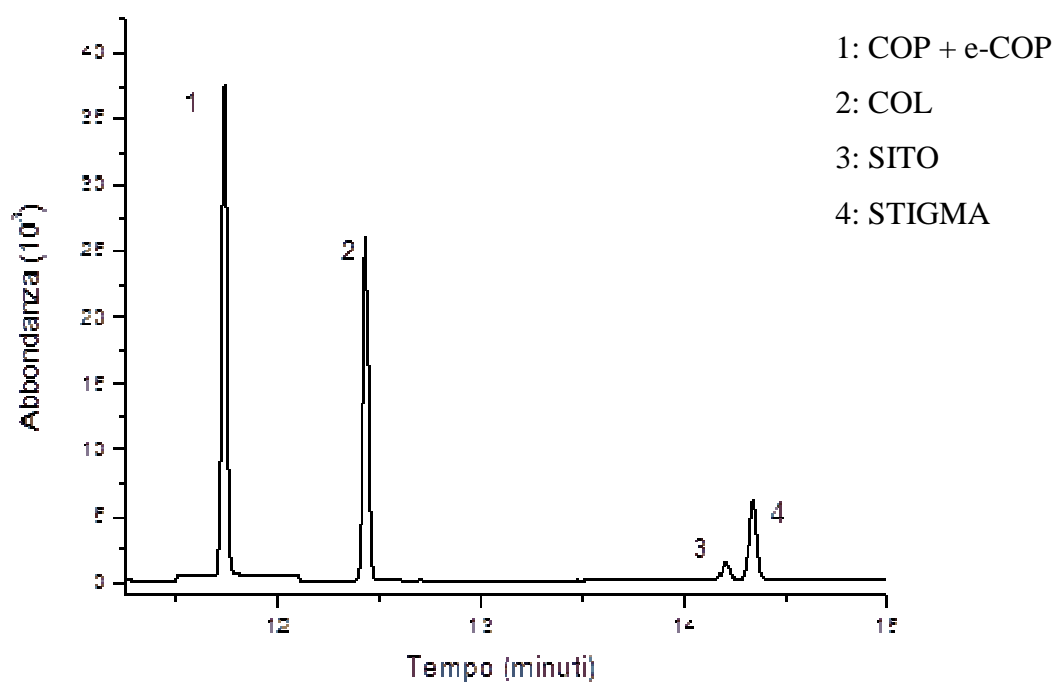


Figura 4.2.: cromatogramma ottenuto dalla soluzione standard.

Come è possibile osservare dalla **Figura 4.2.**, il metodo cromatografico impiegato non consente la separazione del coprostanolo e dell'epi-coprostanolo, isomeri che

presentano diversa disposizione spaziale del gruppo funzionale –OH e punti di ebollizione che si differenziano per pochi decimi di grado centigrado.

Pertanto, le condizioni cromatografiche sono state opportunamente modificate.

In **Figura 4.3.A)** e seguenti, sono riportati i programmi di temperatura impiegati e i corrispondenti cromatogrammi acquisiti.

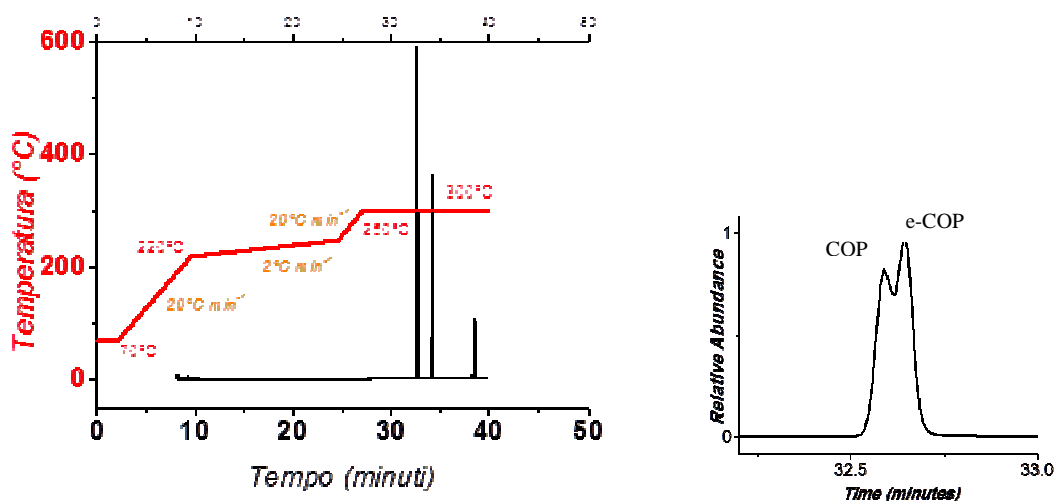


Figura 4.3.A): prima esperienza di separazione di COP ed e-COP. Programma di temperatura e particolare del cromatogramma.

In **Figura 4.3.A)** è possibile osservare che la parziale separazione dei due picchi è stata ottenuta con l'impostazione di una prima rampa di temperatura che da 70°C raggiunge 220°C alla velocità di 20°C min⁻¹. La seconda rampa, compresa tra le temperature di 220 e 250°C è caratterizzata dalla velocità di 2°C min⁻¹, che favorisce l'interazione tra la fase stazionaria della colonna cromatografica e i due steroidi. Constatando che gli analiti vengono eluiti a circa 300°C, a tale temperatura è stata impostata un'isoterma, la

cui durata è stata determinata facendo riferimento ai tempi di ritenzione delle cinque molecole.

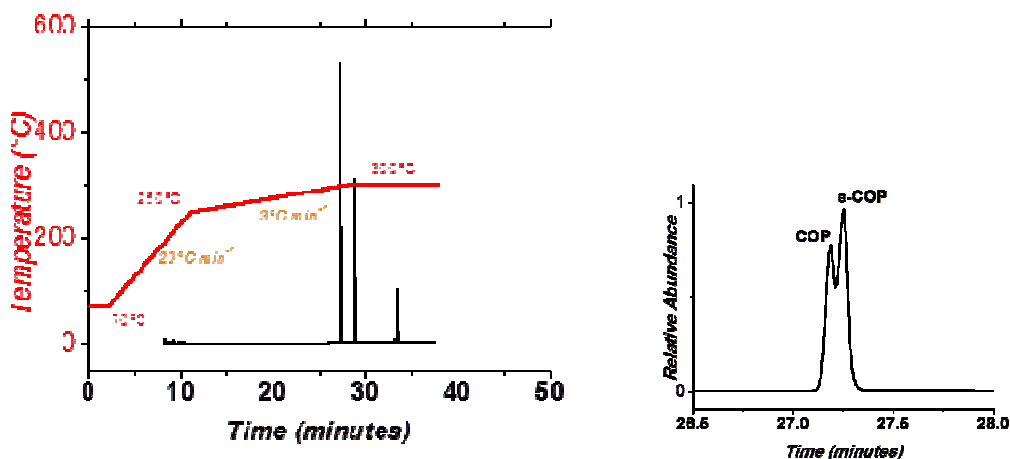


Figura 4.3.B): seconda esperienza di separazione di COP ed e-COP. Programma di temperatura e particolare del cromatogramma.

Le condizioni operative del secondo cromatogramma acquisito, mostrato nella **Figura 4.3.B)**, si differenziano da quelle della prima esperienza per la seconda rampa di temperatura che inizia a 250 °C e raggiunge la temperatura di 300°C alla velocità di 3°C min⁻¹. Sono state scelte temperature e velocità maggiori per cercare di diminuire i tempi di analisi, ma, come è possibile osservare dal cromatogramma, non si ottiene una separazione soddisfacente.

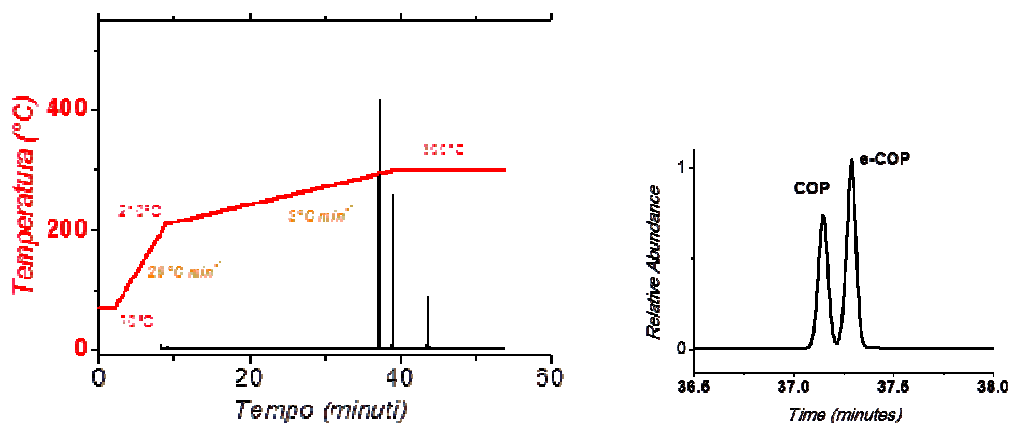


Figura 4.3.C): terza esperienza di separazione di COP ed e-COP. Programma di temperatura e particolare del cromatogramma.

Come è possibile notare dal programma di temperatura riportato in *Figura 4.3.C)*, facendo iniziare la seconda rampa alla temperatura di 210°C, inferiore rispetto a quella della esperienza precedente, e mantenendo la velocità di 3°C min⁻¹ fino all'isoterma, che inizia a 300°C, è possibile ottenere una buona separazione dei picchi la cui risoluzione è pari a 1.4.

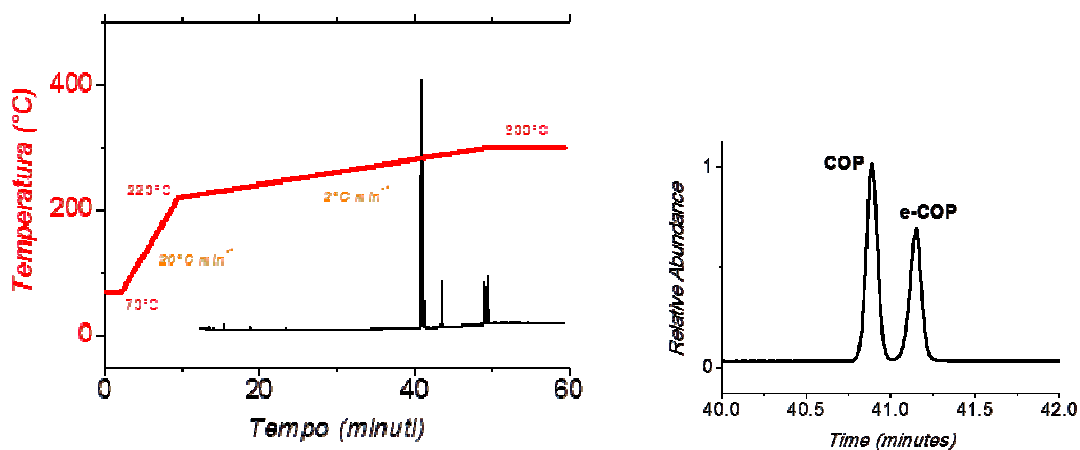


Figura 4.3.D): quarta esperienza di separazione di COP ed e-COP. Programma di temperatura e particolare del cromatogramma.

Diminuendo la velocità a 2°C/min, vi è la completa separazione dei due analiti (vedi *Figura 4.3.D*), verificata anche attraverso il calcolo della risoluzione che presenta il valore di 1.5.

In *Figura 4.4.* è mostrato il cromatogramma in cui tutti gli analiti risultano separati, acquisito con le condizioni operative che sono riportate nella sezione Materiale supplementare.

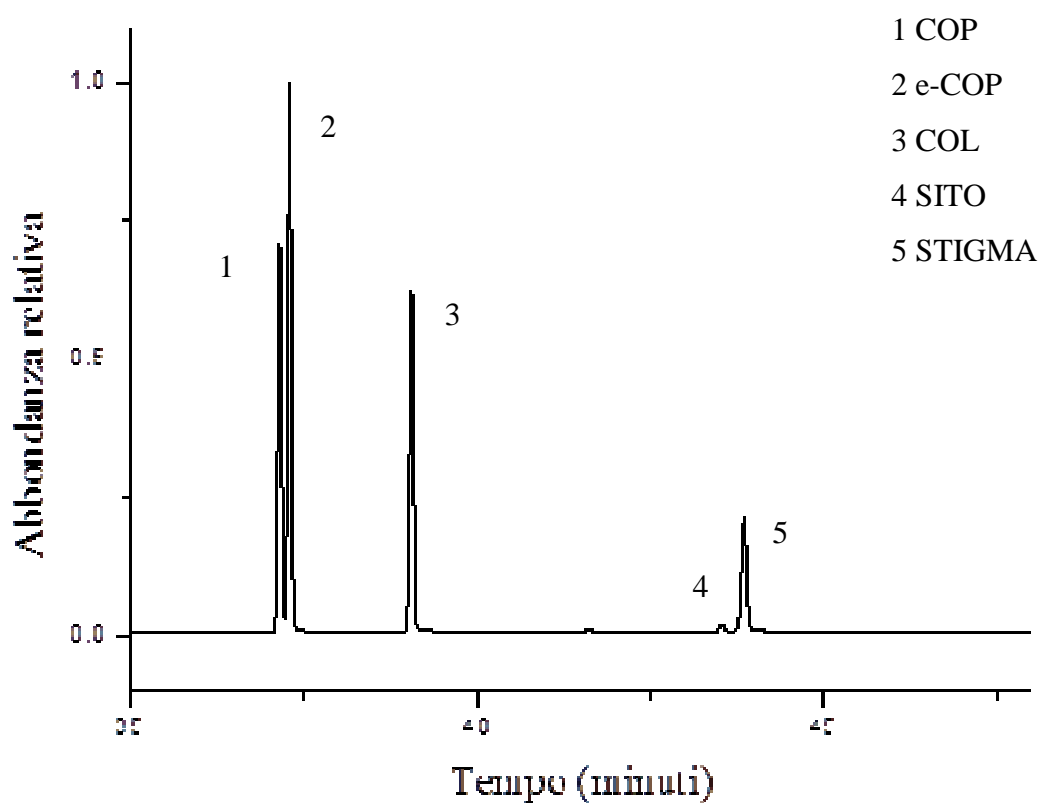


Figura 4.4.: cromatogramma della soluzione standard.

Nella **Tabella 4.2.** sono indicati i tempi di ritenzione ai quali eluiscono le molecole indagate.

Tabella 4.2.: riassunto dei tempi di ritenzione di ciascuno steroide.

Analita	Tempo di ritenzione (minuti)
COP	36.91
e-COP	37.04
COL	38.84
SITO	43.23
STIGMA	43.55

Attraverso questa esperienza è stato possibile, dunque, determinare le migliori condizioni cromatografiche che consentono l'eluizione e la separazione degli analiti.

Per le successive analisi, quindi, verranno impostate due rampe di temperatura, la prima compresa tra 70°C e 220°C con la velocità di 20°C min⁻¹, mentre la seconda inizia a 220°C e raggiunge, alla velocità di 2°C min⁻¹, la temperatura di 300°C, mantenuta costante per 10 minuti e in corrispondenza della quale si verifica l'eluizione degli analiti.

4.3.1 Variabilità della derivatizzazione nel tempo

Per verificare che la reazione di derivatizzazione si mantenesse stabile nel tempo alle condizioni descritte in precedenza (70°C per 1h), 100 µL di *soluzione standard* sono stati derivatizzati con 100 µL di BSTFA ed iniettati dopo 0, 0.5, 1, 2, 3, 24 e 48 h.

La variabilità nel tempo degli analiti derivatizzati è valutata calcolando il rapporto tra l'area di ciascuna molecola e quella dello standard interno, il colesterolo-25,26,27-¹³C₃. I risultati ottenuti sono mostrati in **Figura 4.6.**, in cui viene confrontata la variazione percentuale di ogni composto rispetto al tempo trascorso dal processo di derivatizzazione.

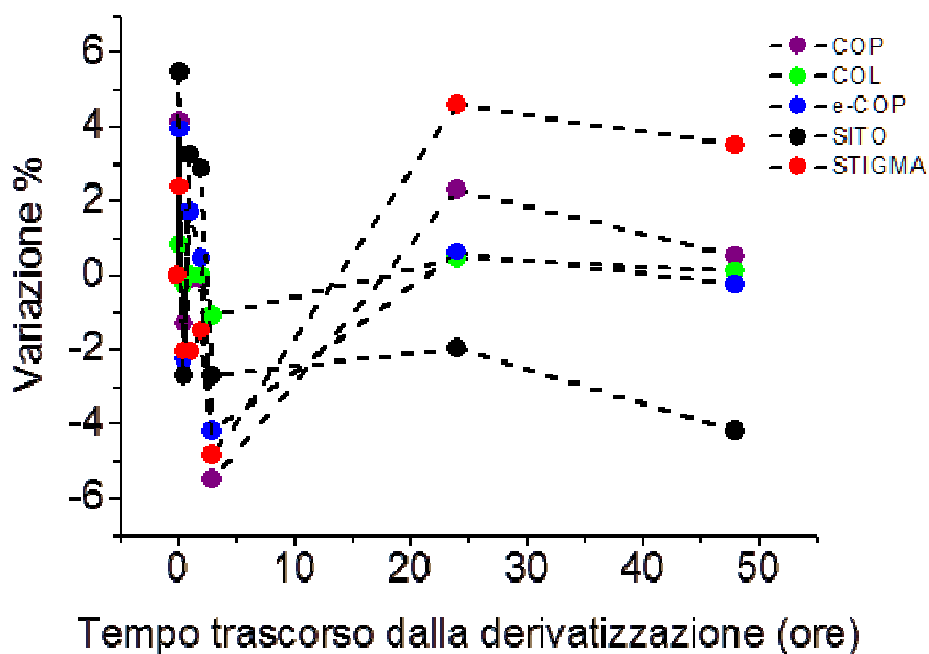


Figura 4.6.: studio della variabilità del processo di derivatizzazione nel tempo.

Come è possibile osservare dalla **Figura 4.6.**, la variazione dei rapporti è piuttosto contenuta e si mantiene entro il 6%. Da tali risultati si assume che la quantità di analita derivatizzato non presenta una significativa variabilità, per quanto non sia possibile stabilire se il processo abbia portato alla completa sililazione dei composti.

Considerata la stabilità degli steroidi fino a due giorni successivi alla derivatizzazione, nelle esperienze successive l'iniezione delle soluzioni al GC-MS verrà effettuata il giorno successivo al trattamento.

4.3.2 Riproducibilità del processo di derivatizzazione

Con questa esperienza è eseguito lo studio sulla riproducibilità, la quale può essere condizionata da variabili, quali il cambiamento della formula molecolare dei composti e la temperatura, incidendo, così, sulla robustezza del metodo analitico che si vuole sviluppare.

In particolare, in tre *vials* sono aggiunti rispettivamente 100 µL di *soluzione standard*, il derivatizzante BSTFA, in ugual volume, ed è stata applicata la procedura di derivatizzazione descritta in precedenza (pag.46). Ogni soluzione è stata analizzata in triplicato.

La riproducibilità è stata valutata eseguendo il Test F di Fisher sui valori medi delle tre repliche dei rapporti dell'area di ciascun analita rispetto a quella dello standard interno (S.I.), il colesterolo-25,26,27-¹³C₃. Tale test permette di stabilire se i valori delle medie appartengono alla stessa distribuzione, attraverso il calcolo del parametro F che viene confrontato con i valori critici tabulati, riportati in Materiale supplementare.

In **Tabella 4.3.A)** e seguenti sono riportati i risultati ottenuti.

Tabella 4.3.A): calcolo del rapporto dell'area del COP rispetto all'area dello S.I., CV e parametro F.

	AREA_{COP} / AREA_{S.I.}	CV
1	1.516	1.2
	1.535	
	1.553	
2	1.684	5.9
	1.508	
	1.540	
3	1.580	2.4
	1.592	
	1.523	
F = 2.27		

Tabella 4.3.B): calcolo del rapporto dell'area dell'e COP rispetto all'area dello S.I., CV e parametro F.

	AREA_{e-COP} / AREA_{S.I.}	CV
1	1.226	6.0
	1.382	
	1.320	
2	1.247	6.5
	1.360	
	1.198	
3	1.240	4.8
	1.358	
	1.268	
F = 3.20		

Tabella 4.3.C): calcolo del rapporto dell'area del SITO rispetto all'area dello S.I., CV e parametro F.

	AREA SITO / AREA S.I.	CV
	0.071	
1	0.068	2.5
	0.068	
	0.563	
2	0.072	9.7
	0.070	
	0.062	
3	0.063	5.9
	0.069	
	F = 4.20	

Tabella 4.3.C): calcolo del rapporto dell'area dello STIGMA rispetto all'area dello S.I., CV e parametro F.

	AREA STIGMA / AREA S.I.	CV
	0.615	
1	0.601	2.0
	0.590	
	0.497	
2	0.661	9.8
	0.624	
	0.531	
3	0.535	9.0
	0.621	
	F = 4.20	

Come è possibile osservare, le misure eseguite presentano una buona precisione. Poiché il valore F calcolato per ogni analita è inferiore al valore critico ($F_{\text{crit.}}=5.14$), la procedura di derivatizzazione risulta riproducibile.

4.3.3 Valutazione dello stato della colonna cromatografica

Considerata la reattività del reagente impiegato come derivatizzante, allo scopo di verificare che quest'ultimo non danneggi la colonna, è stato valutato il cambiamento nel tempo dei tempi di ritenzione caratteristici dei composti indagati. Infatti un significativo cambiamento degli stessi può essere indice della diminuzione delle prestazioni della colonna cromatografica, dovuta all'utilizzo prolungato del BSTFA.

Per questi motivi, sono stati studiati i tempi di ritenzione ricavati da cromatogrammi registrati nell'intervallo temporale di 10 giorni.

La **Figura 4.7.A)** e seguenti mostrano i risultati ottenuti.

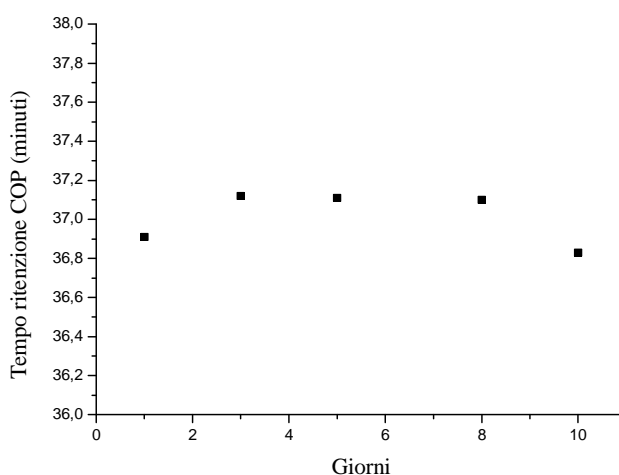


Figura 4.7.A): variazione del tempo di ritenzione del coprostanolo.

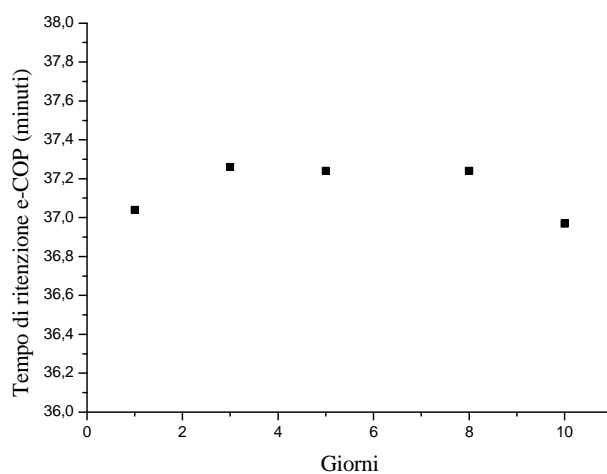


Figura 4.7.B): variazione del tempo di ritenzione dell'epi-coprostanolo.

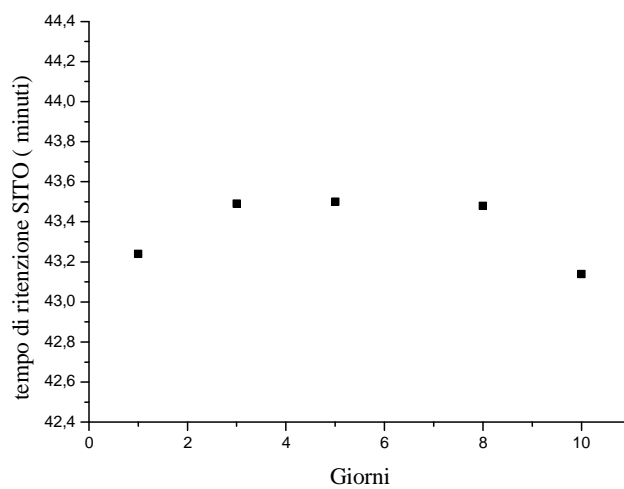


Figura 4.7.C): variazione del tempo di ritenzione del sitosterolo.

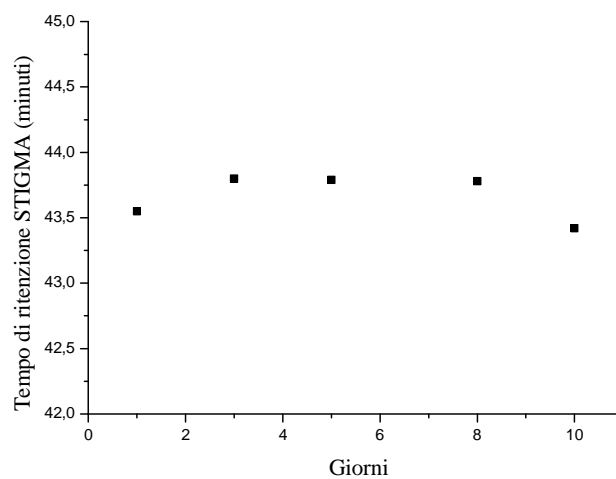


Figura 4.7.D): variazione del tempo di ritenzione dello stigmastanolo.

Come si osserva dalle figure, la variazione del tempo di ritenzione degli analiti è minima e di conseguenza si esclude che il derivatizzante reagisca con la fase stazionaria, comportando la diminuzione delle prestazioni cromatografiche della colonna.

4.4. Riduzione del volume mediante Turbovap®II

Dato che le procedure di estrazione generalmente richiedono volumi di alcune decine di mL, prima di eseguire la purificazione è necessario che gli estratti vengano concentrati.

In particolare, servendosi del Turbovap ® II, il solvente viene fatto evaporare fino al volume di 500 o di 100 µL, tramite il flusso di N₂ e impostando il bagno ad acqua a una temperatura tale da consentire l'evaporazione del solvente, ma non quella dei analiti.

Nelle prove descritte in seguito, la temperatura del bagno ad acqua è di 37°C.

L'operazione di riduzione del volume introduce elevata variabilità nella metodica a causa della diversa tensione di vapore che presentano i composti rispetto a quella dello standard interno, comportando un possibile errore nella quantificazione. Per questa motivazione, è necessario valutare quali siano le condizioni operative che prevedano la minore perdita degli analiti indagati.

4.4.1 Riduzione del volume a 100 µL

In questa esperienza, 100 ng assoluti di una soluzione costituita dagli standard di coprostanolo, epi-coprostanolo, sitosterolo, stigmastanolo e colesterolo-25,26,27-¹³C₃, quale standard interno (S.I.), sono stati aggiunti in un ditale contenente 20 mL di DCM.

Dopo la riduzione del volume a circa 100 µL, sono stati ulteriormente aggiunti 100 ng assoluti dello standard di recupero, colesterolo-3,4-¹³C₂. Con tale procedura vengono eseguite tre repliche.

Per confronto, sono analizzate al GC-MS anche tre repliche della *soluzione standard* (pag. 17), alla concentrazione assoluta di 100 ng, che non hanno subito il processo di riduzione del volume.

Nella **Tabella 4.4.A)** sono indicati i risultati che sono stati ottenuti.

Tabella 4.4.A): valori dei rapporti tra l'area di ciascuno standard rispetto a quella dello standard interno delle tre repliche e CV, calcolati per la soluzione concentrata e la soluzione standard che non ha subito il processo.

	Soluzione concentrata				Soluzione standard	
	Esp 1	Esp 2	Esp 3	CV	media	CV
AREA_{COP}/ AREA_{S.I.}	2.99	2.56	2.83	8.0	2.71	0.4
AREA_{e-COP}/ AREA_{S.I.}	3.40	2.88	3.29	8.0	3.29	4.1
AREA_{SITO}/ AREA_{S.I.}	0.06	0.06	0.08	15.0	0.07	5.9
AREA_{STIGMA}/ AREA_{S.I.}	1.01	0.93	1.19	13.0	0.99	0.3

Confrontando il coefficiente di variazione percentuale misurato per le tre soluzioni concentrate, e il valore medio dello stesso determinato per le tre repliche della *soluzione standard* che non sono state sottoposte alla procedura, **Tabella 4.4.A)**, si può constatare come in questo secondo caso la misura sia caratterizzata da una maggiore precisione,

confermando che la riduzione del volume determina una certa variabilità nella metodica sviluppata.

Impiegando l'espressione indicata nella sezione *Materiale Sperimentale-Quantificazione* (pag. 30) è stato calcolato il recupero apparente per ogni analita.

Poiché è nota la quantità iniziale, 100 ng assoluti, viene determinata la perdita percentuale di ogni composto, secondo la formula:

$$\text{Perdita \%} = (100 - \text{concentrazione analita}) / 100$$

Nella **Tabella 4.4.B)** sono riportati i risultati ottenuti.

Tabella 4.4.B): valore medio della quantità di ciascun analita calcolata per le soluzioni che sono state concentrate, CV e perdita % corrispondenti.

	Recupero apparente (%)	CV	Perdita %
Coprostanolo	102.8	8.0	12.0
Epi-coprostanolo	97.0	8.2	17.0
Sitosterolo	85.3	7.9	7.5
Stigmastanolo	106.0	13.6	9.0

Dai valori indicati nell'ultima colonna della **Tabella 4.4.B)**, si deduce che la metodica impiegata per questa esperienza comporta una perdita piuttosto elevata degli analiti indagati, raggiungendo un massimo di perdita pari al 17% con l'epi-coprostanolo.

4.4.2 Riduzione del volume a secco

Per meglio controllare il processo, è stata valutata la possibilità di portare a secco la soluzione e di ridissolverla in un volume noto di DCM (100 μ L).

L'esperienza consiste in una prima fase in cui la soluzione viene concentrata ad un volume di 100 μ L. Successivamente, la soluzione è trasferita in *vial*, portata a secco tramite flusso di azoto e ripresa con DCM. Prima della derivatizzazione, sono stati aggiunti 100 ng assoluti di standard di recupero, colesterolo-3,4-¹³C₂. Con la stessa metodica sono state eseguite tre repliche e per confronto vengono analizzate anche tre aliquote della *soluzione standard*, a concentrazione assoluta di 100 ng, sulle quali non è stata applicata la procedura appena descritta.

Tabella 4.5.A): valori dei rapporti tra l'area di ciascuno standard rispetto a quella dello standard interno (S.I.) delle tre repliche e CV calcolati per la soluzione concentrata e la soluzione standard che non ha subito il processo di riduzione del volume a secco.

	Soluzione concentrata				Soluzione standard	
	Esp 1	Esp 2	Esp 3	CV	media	CV
AREA_{COP}/ AREA_{S.I.}	2.80	2.69	2.76	2.0	2.71	0.8
AREA_{e-COP}/ AREA_{S.I.}	3.17	3.19	3.32	2.0	3.31	3.9
AREA_{SITO}/ AREA_{S.I.}	0.06	0.07	0.07	6.0	0.07	6.9
AREA_{STIGMA}/ AREA_{S.I.}	0.96	1.04	0.96	5.0	0.99	2.3

Confrontando i valori del coefficiente di variazione percentuale riportati in **Tabella 4.5A)**, con quelli di **Tabella 4.4.A)**, riguardanti l'esperienza precedente, è possibile osservare come la riduzione del volume a secco mostri una minore variabilità. In particolare, nella misurazione del rapporto tra le aree del sitosterolo e del stigmastanolo rispetto allo standard interno, per la procedura di *Riduzione del volume a 100 µL* è stato stimato un valore di CV pari, rispettivamente, a 15 e 13%, mentre, con la procedura appena descritta, il coefficiente di variazione percentuale per questi due analiti è 6 e 5%. Per confronto sono inoltre riportati i valori ottenuti con tre repliche della *soluzione standard*, i cui volumi non sono stati portati a secco.

In **Tabella 4.5.B)** viene riportata la perdita percentuale di ciascun analita.

Tabella 4.5.B): *valore medio della quantità di ciascun analita calcolata per le soluzioni che sono state concentrate a secco, CV e perdita % corrispondenti.*

	Recupero apparente (%)	CV	Perdita %
Coprostanolo	92.3	1.5	13.0
Epi-coprostanolo	101.0	1.5	16.0
Sitosterolo	108.0	5.7	11.0
Stigmastanolo	111.5	0.3	14.0

I risultati derivanti dal calcolo della perdita di ogni steroide sono confrontabili con quelli dell'esperienza precedente, ma la metodica descritta in questo paragrafo presenta una maggiore precisione, evidenziata dai valori di CV compresi tra 0.3 e 5.7 %.

Dai risultati dei due esperimenti illustrati, è possibile stabilire che tra le due procedure, la *Riduzione del volume a secco* è più riproducibile. Infatti, per quanto in entrambe le esperienze si attesta una perdita percentuale media pari a 12%, la seconda presenta una maggiore precisione.

Pertanto, alle fasi di estrazione e di purificazione, seguirà la riduzione del volume a secco, secondo la metodica descritta in questo paragrafo.

4.5. Ottimizzazione della procedura di purificazione

La tecnica di purificazione consente di separare gli analiti da eventuali interferenti, che possono ostacolarne la identificazione e la quantificazione.

Nei successivi paragrafi verrà descritto lo studio di diverse strategie di purificazione eseguito allo scopo di stabilire quale di queste porti a migliori risultati in termini di efficienza, riproducibilità e costi.

Nello specifico, poiché le prime indagini esplorative sono state svolte per stabilire il volume di solvente necessario ad eluire gli analiti indagati, la metodica viene applicata a una soluzione di riferimento costituita dagli standard di coprostanolo, epi-coprostanolo, sitosterolo, stigmastanolo e colesterolo-25,26,27-¹³C₃, quale standard interno.

4.5.1. Purificazione tramite Power Prep™

L'indagine riguardante le condizioni sperimentali da impiegare mediante il sistema di purificazione automatizzato *Power Prep*™ è stata svolta trasferendo in testa alla colonna preimpaccata 100 µL della soluzione di riferimento, diluita fino al volume di 1 mL con DCM. Nella prima fase di purificazione vengono flussati e raccolti 30 mL di esano, per eliminare gli idrocarburi che possono essere presenti in un campione reale. Successivamente sono impiegati 200 mL della miscela n-esano/DCM (1:1, v/v), raccolti in due frazioni distinte, dal volume di 100 mL ciascuna. Le tre frazioni, prima di essere analizzate al GC-MS, sono state concentrate secondo la procedura descritta nel paragrafo *Riduzione del volume a secco* e derivatizzate.

Dai cromatogramma acquisiti, poiché i picchi degli analiti si osservano principalmente nel cromatogramma dell'ultima frazione raccolta, è stato possibile stabilire che gli steroidi non venivano eluiti dal n-esano, ma parzialmente dalla miscela n-esano-DCM, di cui è necessario utilizzare una elevata quantità di volume.

Considerati i risultati ottenuti, si è scelto di verificare i tempi di eluizione degli analiti qualora venga impiegato come solvente DCM. In particolare il processo di frazionamento è stato eseguito impiegando la soluzione di riferimento e 100 mL di DCM, raccolto in 5 frazioni da 20 mL. In **Figura 4.8.** sono riportati gli istogrammi che indicano per ogni composto la quantità di volume di solvente necessaria per l'eluizione.

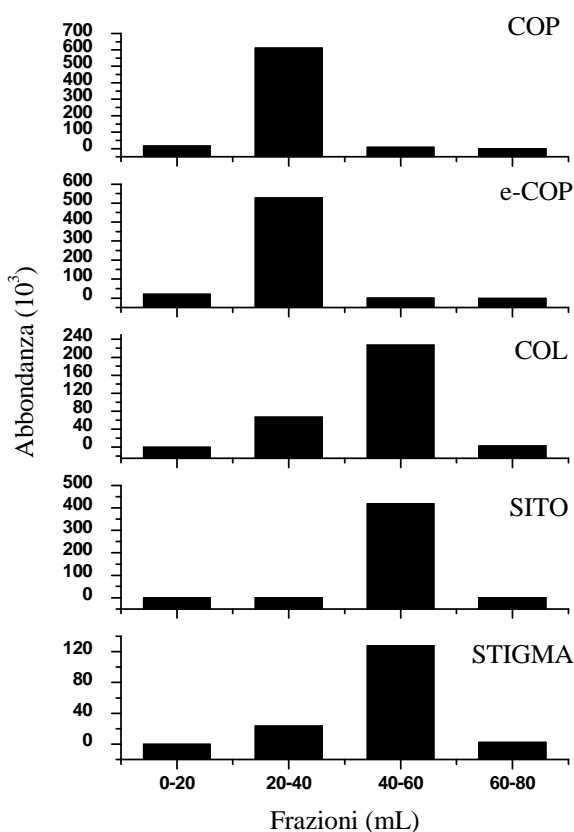


Figura 4.8.: volume di solvente necessario per l'eluizione degli analiti tramite Power Prep™.

È possibile osservare che, nel caso in cui venga utilizzato solo DCM per il frazionamento, è sufficiente un volume inferiore di solvente per l'eluizione degli analiti. In particolare per il frazionamento dello stigmastanolo, del sitosterolo e del colesterolo sono necessari 80 mL, mentre si osserva una maggiore intensità di segnale del coprostanolo e dell'epi-coprostanolo nel cromatogramma della seconda frazione, corrispondente al volume di solvente eluito pari a 40 mL.

Analizzando gli istogrammi sopra riportati, dunque, è possibile stabilire che la completa eluizione degli steroidi avviene con un volume di DCM pari a 80 mL.

Dall'esperienza descritta in questo paragrafo, risulta che la tecnica di purificazione via *Power Prep*TM richiede tempi lunghi di analisi, elevati costi delle colonne cromatografiche monouso e una notevole quantità di solvente. È necessario, pertanto, indagare le prestazioni di una metodica differente.

4.5.2. Purificazione tramite pipetta *Pasteur* con gel di silice

Considerati i risultati ottenuti mediante l'impiego del *Power Prep*TM, è stata esplorata una diversa tecnica di purificazione, che prevedesse costi, tempi di analisi e volumi di solvente minori.

A tale scopo, sono state testate le prestazioni d una colonna cromatografica realizzata con una pipetta *Pasteur*.

La **Figura 4.9.** illustra come viene preparata la *Pasteur*: dopo aver inserito del cotone, la pipetta *Pasteur* viene riempita con 5 cm di gel di silice. Successivamente ne segue l'impaccamento con un volume tale di DCM da portare alla formazione di un gel omogeneo privo di bolle d'aria.

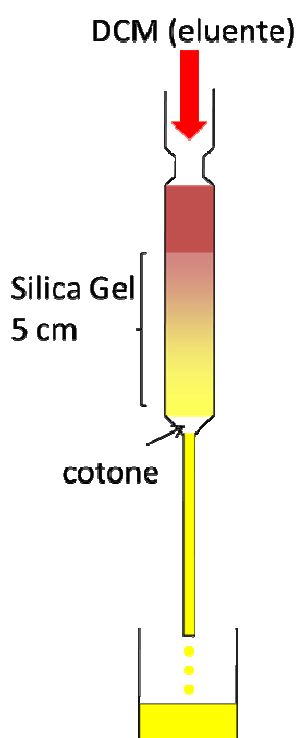


Figura 4.9.: rappresentazione della purificazione eseguita con pipetta *Pasteur* e gel di silice.

È stata quindi valutata la quantità di volume di DCM necessaria per eluire i composti indagati.

Dopo il condizionamento con 40 mL di solvente, nella pipetta *Pasteur*, preparata come indicato in precedenza, sono aggiunti 100 μ L della soluzione di riferimento, che vengono eluiti con 40 mL di DCM e raccolti in 5 frazioni.

La **Figura 4.10.** mostra i cromatogrammi ottenuti delle frazioni.

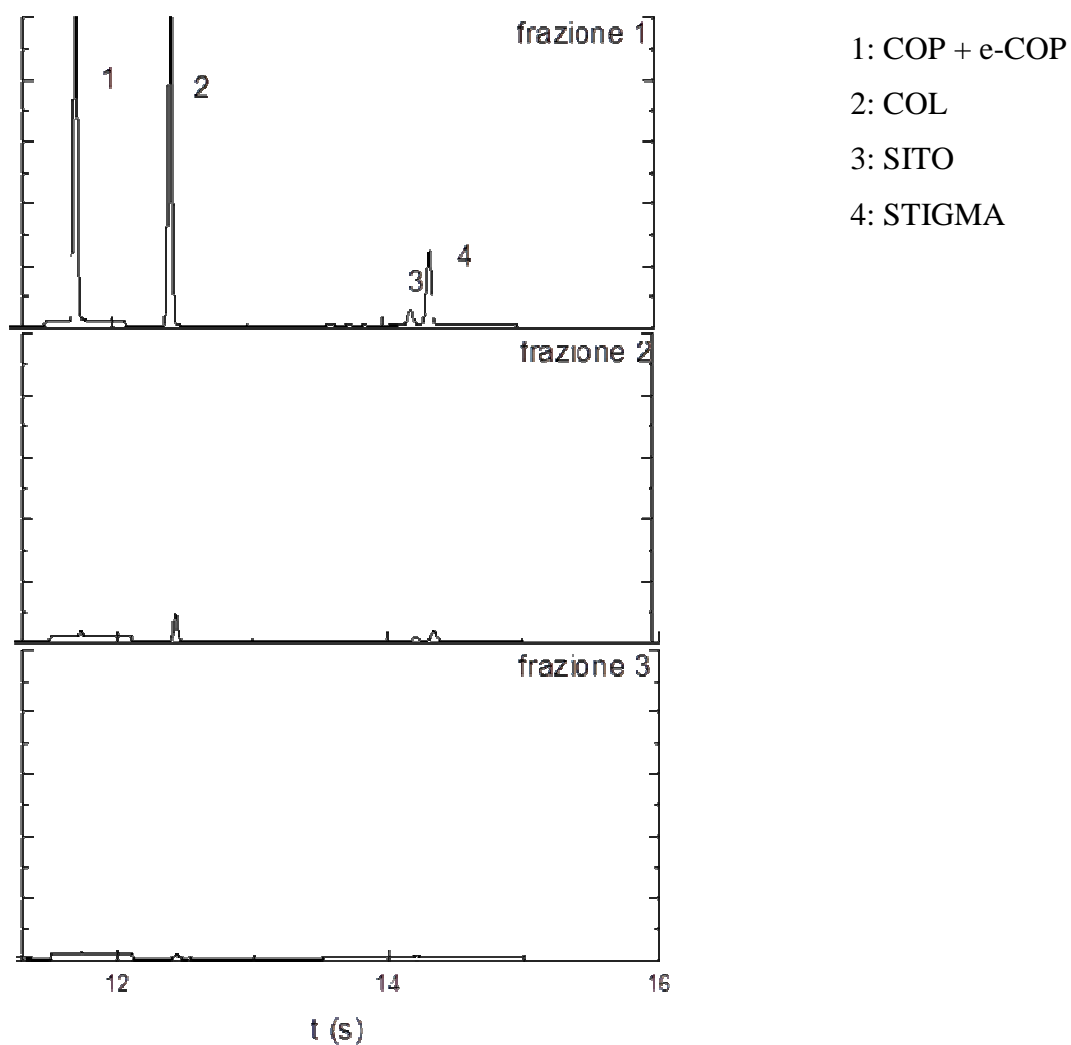


Figura 4.10.: cromatogrammi delle frazioni raccolte dall'eluizione da pipetta Pasteur della soluzione di riferimento e di DCM.

Da tale esperimento è stato possibile stabilire che l'eluizione degli analiti avviene con 16 mL di DCM: infatti nei cromatogrammi delle ultime tre frazioni non si osservano i picchi dei composti.

Per stabilirne la riproducibilità, l'esperienza appena descritta è stata ripetuta seguendo la stessa metodica.

Negli istogrammi indicati nella **Figura 4.11.A)** e seguenti, sono confrontati i risultati ottenuti nelle due repliche, indicate con l'abbreviazione PUR A e PUR B.

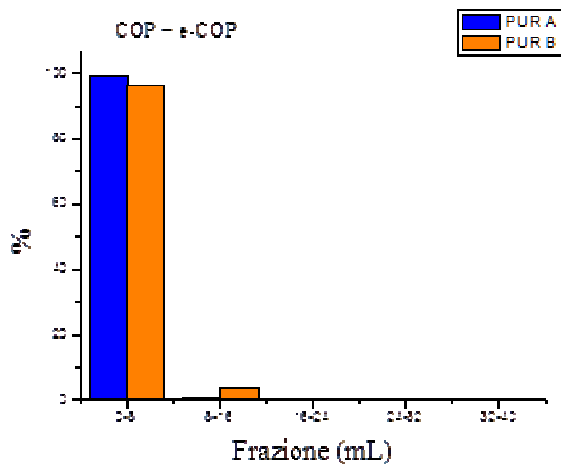


Figura 4.11.A): confronto dei risultati ottenuti dalle due purificazioni eseguite tramite pipetta Pasteur e gel di silice. Particolare: COP + e-COP.

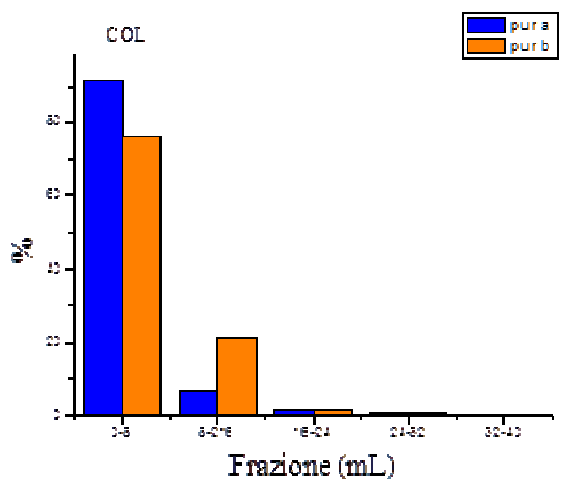


Figura 4.11.B): confronto dei risultati ottenuti dalle due purificazioni eseguite tramite pipetta Pasteur e gel di silice. Particolare: COL.

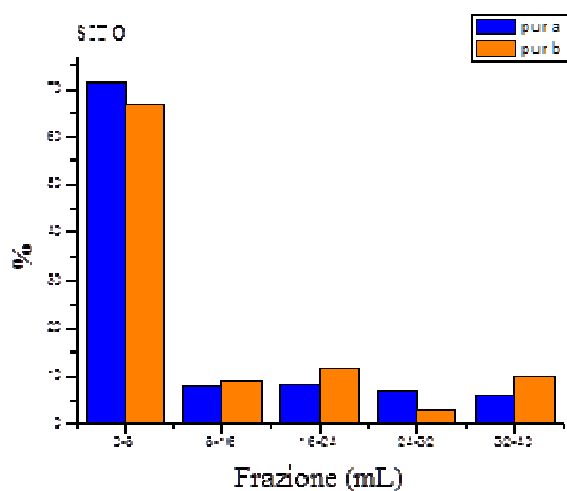


Figura 4.11.C): confronto dei risultati ottenuti dalle due purificazioni eseguite tramite pipetta Pasteur e gel di silice. Particolare: SITO.

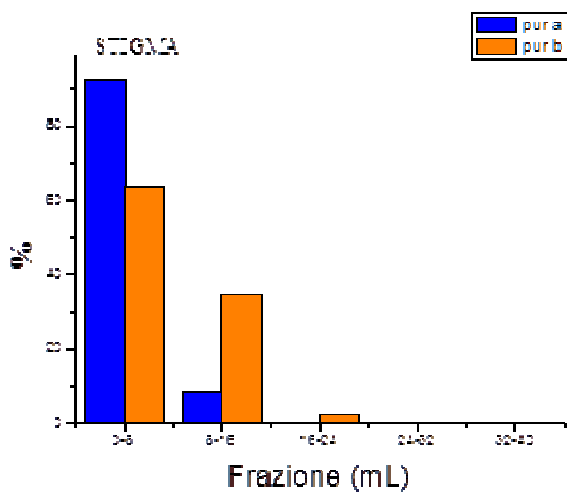


Figura 4.11.D): confronto dei risultati ottenuti dalle due purificazioni eseguite tramite pipetta Pasteur e gel di silice. Particolare: STIGMA.

Se si considerano i risultati ottenuti nella seconda replica, anche in questo caso è possibile stabilire che il volume necessario per l'eluizione degli analiti è pari a 16 mL. Infatti, ad eccezione del sitosterolo, si riscontra la maggiore percentuale dei composti nelle prime due frazioni.

Analizzando per ciascun analita il frazionamento eseguito nelle due esperienze, non si osserva una riproducibilità apprezzabile, eccetto per il coprostanolo e l'epi-coprostanolo. Ad esempio, nella prima esperienza di purificazione, lo stigmastanolo presenta una percentuale di eluizione pari a 90% nella prima frazione e 10% circa in quella successiva. Nella purificazione B, invece, l'analita viene eluito per il 60% con un volume di solvente pari a 6 mL e il restante 40% si riscontra nella seconda frazione (8-16 mL).

Considerata la variabilità dei risultati, il volume di DCM scelto per l'eluizione completa delle molecole è 25 mL.

La riproducibilità di questa tecnica di purificazione è valutata eseguendo tre repliche, che prevedono la raccolta di 25 mL di DCM con cui sono eluiti 100 ng assoluti della soluzione di riferimento, in accordo con l'esperimento precedente. Per ogni soluzione vengono fatte tre misure al GC-MS.

Nella **Tabella 4.6.** e seguenti, sono riportati i valori del rapporto delle aree di ciascun analita rispetto all'area dello standard interno, il colesterolo-25,26,27-¹³C₃, calcolati per ogni replica, il coefficiente di variazione percentuale e il parametro F, che permette di valutare la riproducibilità della tecnica.

Tabella 4.6.A): calcolo del rapporto dell'area del COP rispetto all'area dello S.I., CV e parametro F.

	AREA COP / AREA S.I.	CV
1	1.532	4.0
	1.621	
	1.658	
2	1.346	5.8
	1.506	
	1.470	
3	1.445	3.6
	1.538	
	1.544	
	F = 4.20	

Tabella 4.6.B): calcolo del rapporto dell'area dell'e-COP rispetto all'area dello S.I., CV e parametro F.

	AREA e-COP / AREA S.I.	CV
1	1.342	4.2
	1.301	
	1.298	
2	1.346	3.8
	1.306	
	1.270	
3	1.389	5.1
	1.308	
	1.282	
	F = 3.67	

Tabella 4.6.C): calcolo del rapporto dell'area del SITO rispetto all'area dello S.I., CV e parametro F.

	AREA SITO / AREA S.I.	CV
1	0.175	0.5
	0.176	
	0.174	
2	0.151	5.9
	0.134	
	0.142	
3	0.153	5.5
	0.146	
	0.136	
F = 21.54		

Tabella 4.6.D): calcolo del rapporto dell'area dello STIGMA rispetto all'area dello S.I., CV e parametro F.

	AREA STIGMA / AREA S.I.	CV
1	0.695	1.8
	0.698	
	0.674	
2	0.770	5.4
	0.695	
	0.712	
3	0.712	4.1
	0.662	
	0.665	
F = 2.14		

Applicando il test F di Fisher sui valori del rapporto dell'area di ciascun analita rispetto a quella dello standard interno, il parametro F ottenuto è inferiore a quello critico ($F_{crit} = 5.14$) per il coprostanolo, l'epi-coprostanolo e lo stigmastanolo. Tale tecnica di purificazione, invece, non risulta riproducibile per il sitosterolo, per il quale il parametro F è 21.54, indice che le medie dei rapporti non appartengono alla stessa distribuzione.

Dai risultati delle esperienze eseguite, appare evidente che, per quanto sia poco costosa e preveda l'impiego di contenute quantità di solvente, tale tecnica di purificazione non sia riproducibile. Ciò è dovuto, in parte, alla difficoltà di applicare le stesse condizioni operative durante il condizionamento, che non porta sempre alla formazione di un gel omogeneo e privo di bolle d'aria.

Va inoltre considerato che i tempi richiesti per la preparazione delle colonne risultano essere lunghi e inadatti all'analisi di un elevato numero di campioni.

4.5.3. Purificazione via SPE con cartuccia con silice neutra (1 g, 6 mL)

Poiché la variabilità che caratterizza la tecnica di purificazione analizzata precedentemente è dovuta soprattutto a errori sperimentali causati dall'operatore, in questo paragrafo vengono valutate le prestazioni della *solid-phase extraction* (SPE), che prevede l'utilizzo di cartucce monouso preimpaccate.

Anche in questo caso, la prima fase dello studio prevedeva la determinazione del volume di solvente necessario per l'eluizione degli analiti indagati.

Dopo il condizionamento con 10 mL di DCM, nella cartuccia contenente 1 g di silice neutra come fase stazionaria, sono aggiunti 100 μ L di *soluzione standard* e 20 mL di DCM, raccolti in 4 frazioni da 5 mL. Dopo la concentrazione e la derivatizzazione, secondo le modalità descritte in precedenza, le frazioni sono analizzate al gascromatografo. Le **Figure 4.12.** e **4.13.** mostrano gli istogrammi e i cromatogrammi delle varie frazioni.

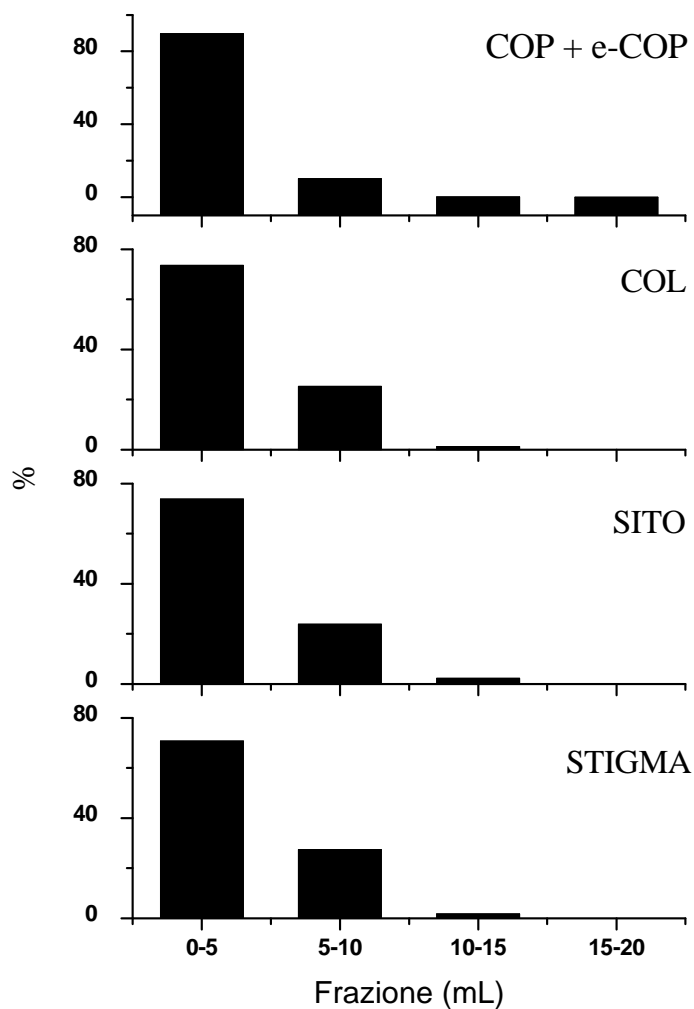


Figura 4.12.: istogrammi in cui viene riportata la percentuale dei composti eluiti nelle 5 frazioni, indicate con il volume di solvente impiegato.

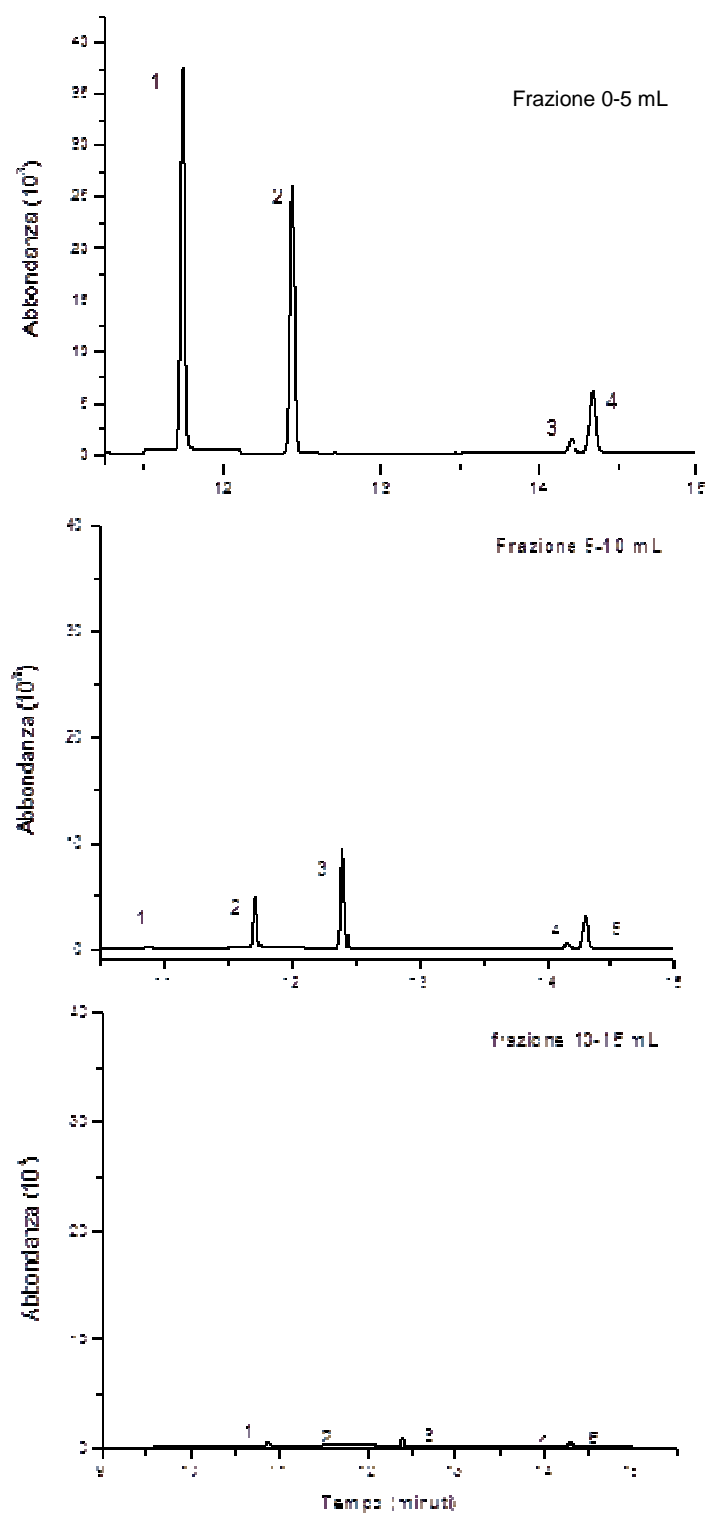


Figura 4.13.: cromatogrammi delle prime tre frazioni. In particolare :1: COP + e-COP, 2: COL; 3: SITO; 4:STIGMA.

Come è possibile verificare dagli istogrammi, in cui viene correlata la percentuale di analita eluito rispetto alle frazioni, indicate con il volume di solvente utilizzato, tutti i composti eluiscono principalmente entro 10 mL di DCM. Tale volume di eluizione viene confermato anche dal cromatogramma della terza frazione, mostrato in **Figura 4.13.**, in cui non sono registrati i picchi degli steroidi.

Dato che tale tecnica di purificazione presenta tempi, costi e quantità di solvente contenuti, di seguito ne vengono valutate efficacia, precisione e riproducibilità, applicando la procedura all'estratto di un campione reale.

Dopo aver estratto 20 g di sedimento, dal volume ottenuto di circa 200 mL sono prelevati 10 mL, corrispondenti all'estrazione di 1g, che vengono concentrati secondo la procedura descritta nel paragrafo *Riduzione del volume a secco*.

All'aggiunta di 100 ng assoluti di colesterolo-25,26,27-¹³C₃, quale standard interno, segue la procedura di purificazione via SPE, da cui si ottiene l'eluato che viene nuovamente concentrato. Prima della derivatizzazione, sono aggiunti 100 ng assoluti di colesterolo-3,4-¹³C₂, impiegato come standard di recupero.

Al GC-MS vengono registrati i cromatogrammi di tre repliche dello stesso estratto e della *soluzione standard* su cui non è applicata la procedura e della quale sono state eseguite tre misurazioni.

La **Figura 4.14.** mostra il cromatogramma ottenuto dall'analisi di una delle tre repliche dell'estratto del campione reale.

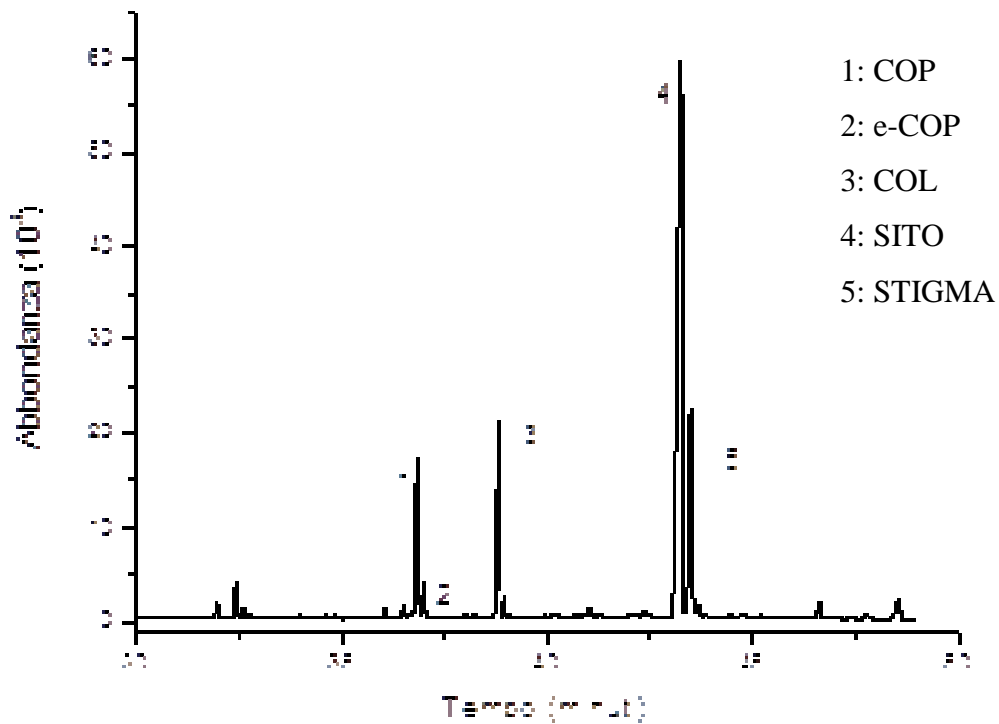


Figura 4.14.: cromatogramma dell'estratto di sedimento purificato via SPE con cartuccia con 1g di silice neutra.

Come è possibile osservare dalla figura sopra riportata, nel cromatogramma si riscontrano, oltre i picchi caratterizzanti i composti indagati, anche quelli di altre molecole, che non sono state trattenute dalla fase stazionaria della cartuccia impiegata per la purificazione.

La presenza di eventuali interferenti è stata valutata calcolando il rapporto tra le aree dello ione qualificatore e lo ione target per ogni analita, ricavate dall'integrazione dei picchi dei cromatogrammi dell'estratto di sedimento e della *soluzione standard*.

Tabella 4.7.: calcolo del rapporto tra le aree dello ione qualificatore e lo ione target e CV per le tre repliche della purificazione dell'estratto di sedimento con cartucce con 1 g di fase stazionaria.

Ione Q / ione T	Estratto purificato				Soluzione standard	
	ESP. 1	ESP 2	ESP.3	CV	media	CV
COP	1.03	1.49	0.99	23.5	1.56	7.7
e-COP	0.85	0.45	1.01	37.1	0.75	0.9
SITO	3.13	2.10	2.78	19.5	5.66	4.2
STIGMA	0.18	0.13	0.14	19.2	0.15	8.1

Analizzando il rapporto tra le aree dello ione qualificatore e dello ione target di ciascun analita, riportati in **Tabella 4.7.**, è evidente che esse differiscono in modo significativo con i valori calcolati per la *soluzione standard*. La differenza riscontrata tra i rapporti calcolati per l'estratto e la soluzione standard è indice della presenza di interferenti, causando, di conseguenza, errore nella quantificazione degli steroidi.

Oltre a non essere efficace, tale tecnica di purificazione è poco precisa, come è possibile notare dal coefficiente di variazione percentuale, riportato in **Tabella 4.7.**, il cui massimo valore determinato è 37% per l'epi-coprostanolo.

4.5.4. Purificazione via SPE con cartuccia con silice neutra (2 g, 12 mL)

Dall'esperienza descritta nel paragrafo precedente, è emerso che la purificazione, eseguita con cartucce contenenti 1 g di silice neutra, non ha portato a una efficace separazione degli analiti dagli interferenti.

Per questo motivo vengono sperimentate cartucce che presentano una quantità di fase stazionaria maggiore, pari a 2 g.

La determinazione del volume di solvente viene eseguita facendo eluire e raccogliendo in 5 frazioni 100 mL di DCM, dopo aver aggiunto nella cartuccia 100 μ L di *soluzione standard*.

In **Figura 4.15.** sono riportati gli istogrammi che correlano la percentuale di ciascun composto eluito in ogni frazione, con il volume di solvente impiegato.

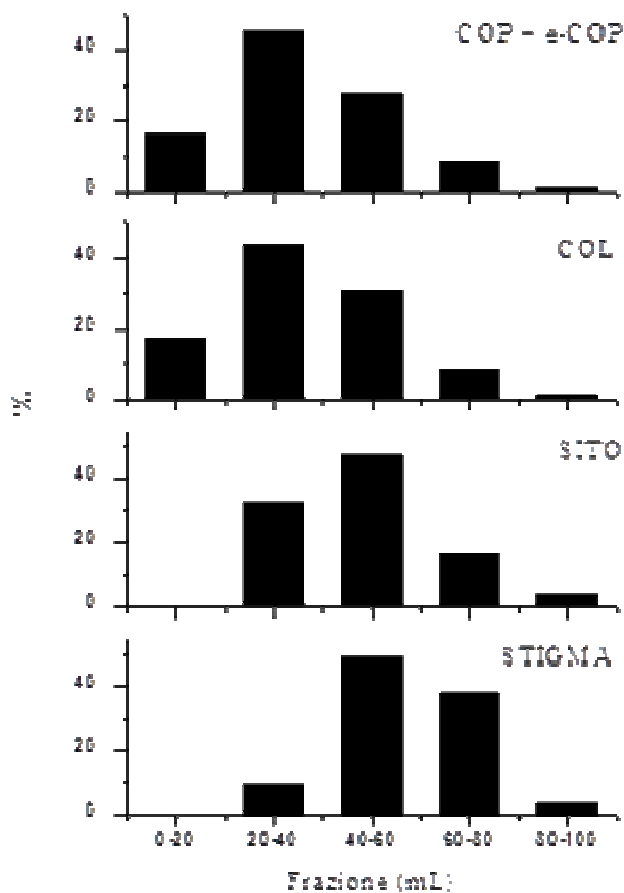


Figura 4.15.: istogrammi in cui viene riportata la percentuale dei composti eluiti nelle 5 frazioni, indicate con il volume di solvente impiegato.

Da questo studio è possibile stabilire che il coprostanolo, l'epi-coprostanolo e il colesterolo sono eluiti principalmente entro 40 mL di solvente, mentre per gli altri due analiti è necessario una maggiore quantità di DCM, soprattutto per lo stigmastanolo del quale si riscontra un'alta percentuale anche nella quarta frazione, che corrisponde a un volume di solvente pari a 80 mL.

Per queste motivazioni è stato possibile determinare che il volume di 75 mL consente l'eluizione completa delle molecole. Stabilito il volume di DCM che consente il frazionamento di ogni analita, vengono valutate le prestazioni su un campione reale di tale tecnica di purificazione, applicandola all'estratto di sedimento.

Per questa esperienza, è utilizzata la stessa metodica descritta nel paragrafo precedente (pag.73) all'estratto di sedimento, prelevato in prossimità di uno scarico domestico e di cui viene analizzato il volume di 10 mL. Di seguito in **Figura 4.16.** è mostrato il cromatogramma ottenuto.

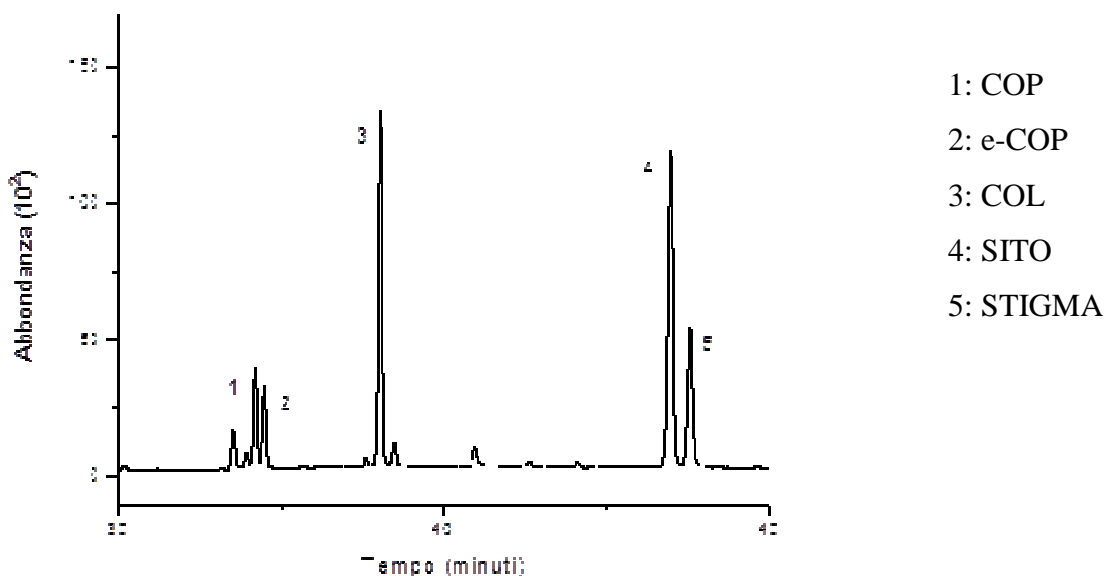


Figura 4.16.: cromatogramma dell'estratto di sedimento purificato via SPE con cartuccia con 2g di silice neutra.

Per verificare se questa procedura consentisse una purificazione più efficace dalle molecole interferenti, è stato calcolato il rapporto tra l'area dello ione qualificatore rispetto a quella dello ione target per ogni analita e i valori ottenuti vengono confrontati con quelli misurati per la *soluzione standard*, sui cui non è stata eseguita la metodica. Nella **Tabella 4.8.** sono indicati i rapporti ottenuti per ogni replica che è stata eseguita e il coefficiente di variazione percentuale.

Tabella 4.8.: calcolo del rapporto tra le aree dello ione qualificatore e lo ione target e CV per le tre repliche della purificazione dell'estratto di sedimento con cartucce con 2g di fase stazionaria e per la soluzione standard.

Ione Q / ione T	Estratto purificato				Soluzione standard	
	ESP. 1	ESP 2	ESP.3	CV	media	CV
COP	1.65	1.62	1.66	1.2	1.68	1.2
e-COP	0.68	0.69	0.69	1.3	0.76	1.1
SITO	5.43	5.56	5.65	1.9	5.40	3.2
STIGMA	0.18	0.19	0.20	5.2	0.17	4.0

Analizzando i risultati riportati nelle due tabelle precedenti è possibile constatare che questa tecnica di purificazione sia caratterizzata da una elevata precisione, determinata dai valori di CV calcolati per l'estratto purificato, **Tabella 4.8.**, compresi tra 1.2 e 5.2%. È evidente inoltre che i rapporti tra le aree dello ione qualificatore e lo ione target, calcolati per il campione reale non differiscono significativamente da quelli misurati per la *soluzione standard*, indice che l'eventuale quantificazione degli steroidi non è caratterizzata da errore a causa della presenza di interferenti.

Dagli studi effettuati in questo paragrafo, si può stabilire che la metodica caratterizzata da maggior efficacia e riproducibilità è quella che prevede la purificazione via SPE con l'utilizzo di cartucce con 2g di silice neutra e l'eluizione di 75 ml di DCM.

4.6. Ottimizzazione della fase di estrazione

La procedura di estrazione del sedimento è stata realizzata mediante *PLE* (*pressurized liquid extraction*).

La prima condizione operativa indagata riguarda il numero di cicli estrattivi necessari all'estrazione dei composti.

Per questa esperienza, nella *vessel*, contenente sabbia di *Ottawa* e terra di diatomee, sono aggiunti 100 μL di *soluzione standard*, che viene estratta con una miscela DCM/MeOH (9:1, v/v), solitamente impiegata per questo genere di estrazione [4], [5], [16]. Lo strumento è stato programmato per eseguire 4 cicli estrattivi, a temperatura e pressione di 100°C e 1000 psi, rispettivamente. A conclusione di ogni ciclo viene raccolto l'estratto ottenuto.

In *Figura 4.17*. viene riportato il cromatogramma del primo ciclo estrattivo.

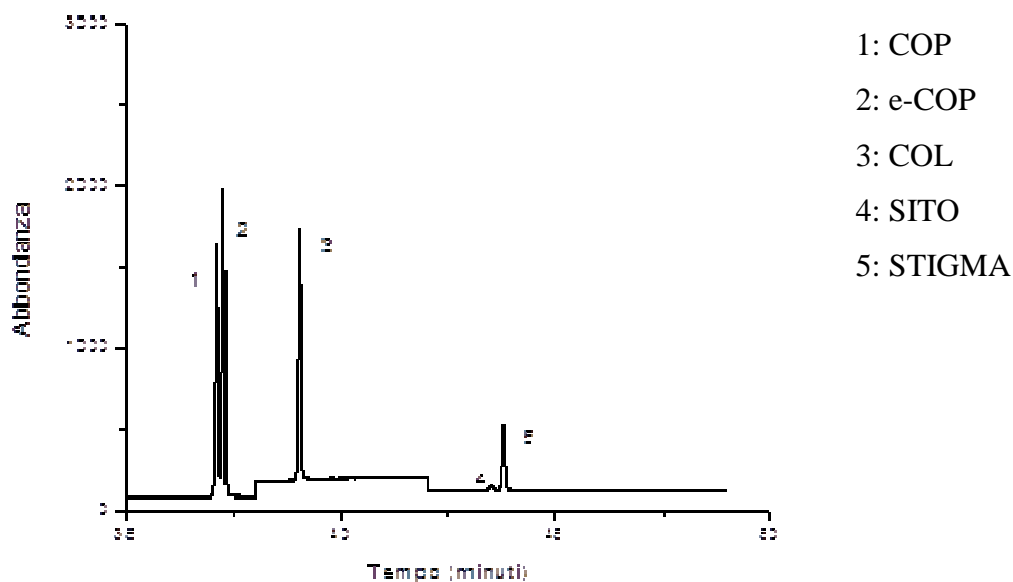


Figura 4.17.: cromatogramma della soluzione standard estratta via PLE.

Constatando che nei cromatogrammi degli altri tre cicli estrattivi non vengono registrati i picchi degli analiti, è possibile stabilire che l'estrazione dei composti si verifica con il primo ciclo.

La procedura descritta all'inizio del paragrafo è stata adottata per estrarre 1g di un sedimento certificato per i composti inorganici.

La **Figura 4.18.** mostra il cromatogramma che è stato acquisito analizzando il primo ciclo di estrazione al GC-MS.

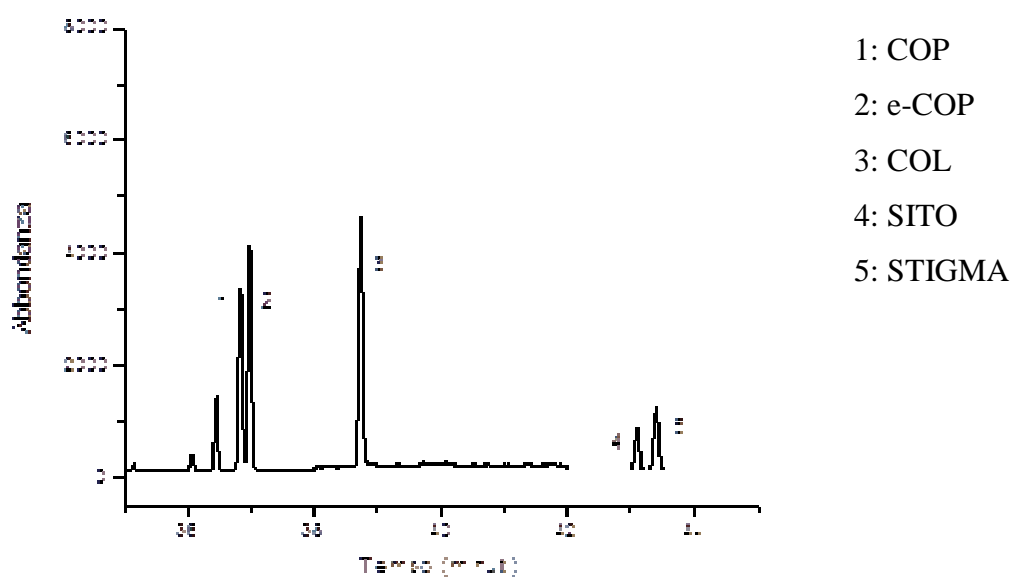


Figura 4.18.: cromatogramma del sedimento certificato per composti inorganici estratto via PLE.

I risultati di questa esperienza sono gli stessi ottenuti dall'analisi della *soluzione standard*, in quanto anche in questo caso non si registrano i picchi degli steroidi negli altri cromatogrammi.

Questi studi hanno consentito di stabilire le condizioni operative dell'estrazione, che prevedono l'impiego della miscela DCM/MeOH (9:1, v/v) e la programmazione dello strumento a eseguire due cicli estrattivi, a velocità di flusso pari a 25 mL/min e a temperatura e pressione a 100°C e 1000 psi, rispettivamente.

In seguito all'estrazione del sedimento certificato, è stata eseguita la pulizia, impiegando la *vessel* utilizzata unicamente per i lavaggi e facendo fluire nelle linee dello strumento la miscela DCM/MeOH per due cicli estrattivi, alla temperatura di 100°C e la pressione a 2300 psi.

Allo scopo di verificare se questo programma di pulizia fosse efficace per eliminare eventuali steroidi rimasti nel PLE, viene eseguita un'estrazione impostando lo strumento alle condizioni stabilite con i precedenti esperimenti e mantenendo la *vessel* dei lavaggi.

Dall'elaborazione del cromatogramma, acquisito analizzando l'estratto raccolto, si ottengono valori di concentrazione degli analiti che risultano inferiori al limite di rivelabilità e di quantificazione.

È possibile stabilire che il programma di pulizia eseguito elimini gli eventuali composti rimasti nelle linee dello strumento, che pertanto non risulta contaminato per future analisi.

5. IL METODO ANALITICO: *valutazione delle performances analitiche e validazione*

Di seguito sono riassunte le fasi che costituiscono il metodo analitico che è stato sviluppato sulla base delle esperienze precedentemente condotte e descritte nel Capitolo 4.

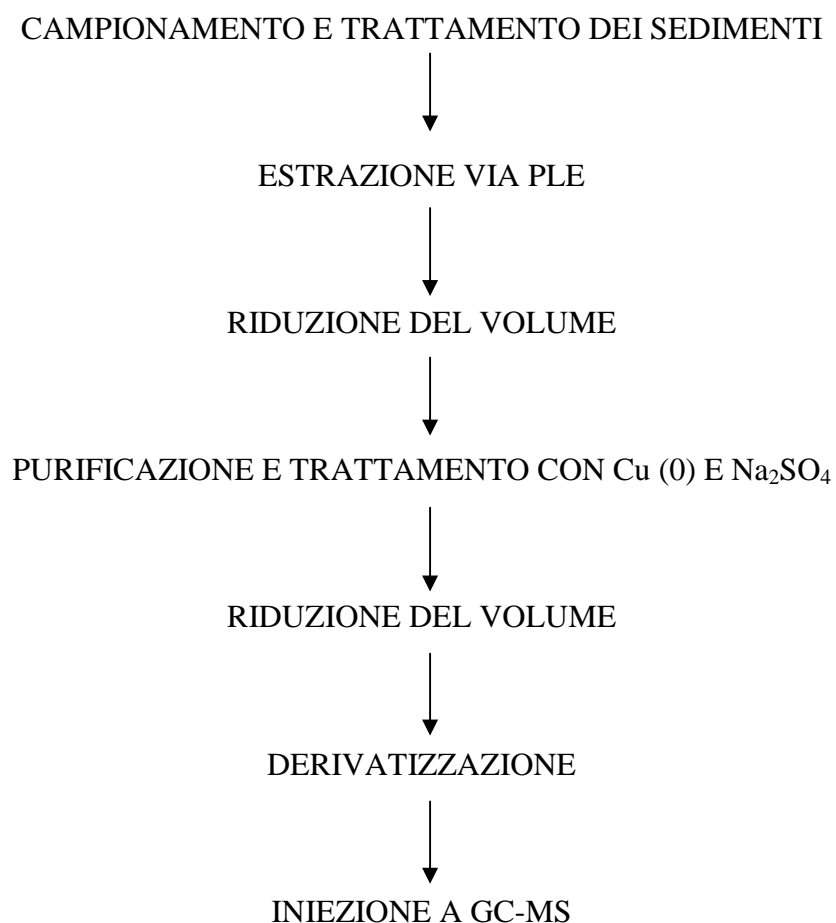


Figura 5.1.: riassunto delle fasi che costituiscono il metodo analitico sviluppato.

5.1. Determinazione della linearità

La linearità di risposta consiste nella capacità di un metodo analitico di fornire risultati direttamente proporzionali alla concentrazione di analita presente nel campione.

In particolare, per la verifica di tale parametro vengono registrati i cromatogrammi iniettando delle soluzioni standard in cui ogni analita è presente in concentrazione crescente: 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 e 5.0 ng μL^{-1} . Per controllare l'evaporazione del volume in seguito alla derivatizzazione e la conseguente variazione delle concentrazioni sopra indicate, è stato utilizzato uno standard interno (colesterolo-25,26,27- $^{13}\text{C}_3$). I risultati ottenuti sono stati riportati nel grafico mostrato in **Figura 5.2.**

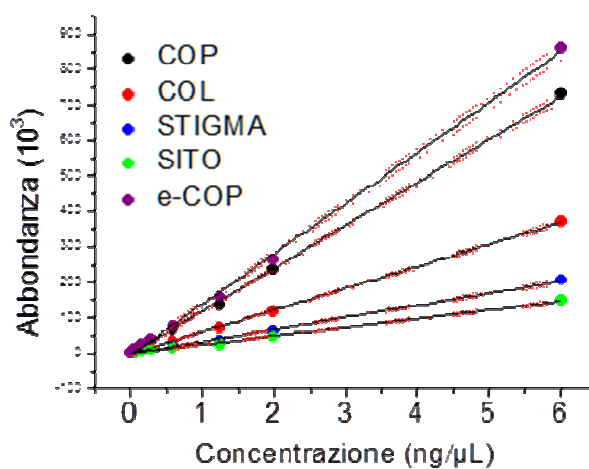


Figura 5.2.: Linearità del metodo proposto.

Come è possibile osservare, il segnale registrato risulta lineare ($r^2 = 0.993 - 0.999$) rispetto alla concentrazione di tutti gli steroidi indagati in un *range* di concentrazione compreso tra 0.005 - 5.0 ng μL^{-1} .

5.2. Calcolo dei limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) strumentali

Il calcolo dei limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) strumentali per ogni composto è stato misurato utilizzando le formule riportate nel paragrafo *Quantificazione* (pag.31). I valori della pendenza e della intercetta sono stati ricavati dalla retta di calibrazione, ottenuta nel range 0.05-0.5 ng/ μL^{-1} .

La **Tabella 5.1.** riassume, per ogni molecola, la concentrazione corrispondente al segnale minimo significativo e il valore minimo che lo strumento può rilevare per una misura quantitativa.

Tabella 5.1.: valori di LOD e LOQ strumentali calcolati per ciascuno steroide.

	LOD pg μL^{-1}	LOQ pg μL^{-1}
Coprostanolo	30	100
Epi-coprostanolo	70	240
Sitosterolo	20	60
Stigmastanolo	70	220

5.3. Determinazione dei bianchi procedurali

I bianchi procedurali sono stati determinati estraendo una *vessel* contenente la sabbia di *Ottawa* e la terra di diatomee, alle quali sono stati aggiunti 100 ng di colesterolo-25,26,27-¹³C₃. L'estratto ottenuto viene successivamente concentrato e purificato. In questo modo i bianchi saranno rappresentativi di eventuali contaminazioni dovute al solvente, al laboratorio e ai materiali impiegati. In **Tabella 5.2.** vengono riportati i valori di LOD e LOQ per ogni analita, calcolati con la stessa procedura indicata per i limiti di rivelabilità e di quantificazione strumentali (pag. 85).

Tabella 5.2.: valori di LOD e LOQ procedurali calcolati per ciascuno steroide.

	LOD	LOQ
	pg oc	pg oc
Coprostanolo	<LOD	<LOQ
Epi-coprostanolo	<LOD	<LOQ
Colesterolo	120	400
Sitosterolo	310	1033
Stigmastanolo	<LOD	<LOQ

Come è possibile osservare dai risultati sopra riportati, la quantità di coprostanolo, epi-coprostanolo e stigmastanolo risultano inferiori ai limiti di rivelabilità e quantificazione strumentali. Il sitosterolo e il colesterolo, invece, sono presenti in quantità superiore al LOD e al LOQ, in quanto possono essere originati da prodotti di combustione presenti nel particolato.

5.4 VALIDAZIONE DEL METODO

L'indagine riguardante la validazione prevede lo studio dell'accuratezza e della precisione del metodo che viene applicato su matrici diverse, non essendo disponibili riferimenti certificati per gli analiti in esame.

5.4.1. Determinazione della precisione e della accuratezza del metodo

5.4.1.1. Applicazione del metodo su una soluzione di riferimento

Con questo primo studio si vuole determinare la precisione e l'accuratezza del metodo, applicando la procedura ottimizzata a una matrice meno complessa dal punto di vista compositivo, rispetto a quella di un sedimento.

In particolare 100 ng assoluti della soluzione di riferimento, costituita da coprostanolo, epi-coprostanolo, sitosterolo, stigmastanolo e colesterolo-25,26,27-¹³C₃, sono aggiunti alla *vessel* impiegata per l'estrazione contenente sabbia di *Ottawa* e terra di diatomee. Prima dell'analisi al GC-MS, sono aggiunti 100 ng assoluti dello standard di recupero, colesterolo-3,4-¹³C₂. Le estrazioni sono state eseguite in triplicato.

In **Tabella 5.3.** sono indicati, per ogni analita, il rapporto tra l'area dello ione qualificatore rispetto a quella dello ione target, calcolati per le tre repliche, e il coefficiente di variazione percentuale.

Tabella 5.3.: calcolo del rapporto tra le aree dello ione qualificatore e lo ione target e CV per le tre repliche della soluzione di riferimento.

Soluzione di riferimento					Soluzione standard	
Ione Q / ione T	ESP. 1	ESP 2	ESP.3	CV	media	CV
COP	1.68	1.73	1.75	1.9	1.70	1.0
e-COP	0.79	0.78	0.78	1.2	0.77	1.3
SITO	3.64	4.90	4.87	9.9	5.37	3.0
STIGMA	0.18	0.18	0.17	2.0	0.17	2.0

Esaminando i valori della **Tabella 5.3.**, è possibile osservare una bassa variabilità nella misura del rapporto tra le aree degli ioni, data dai valori del coefficiente di variazione che risultano inferiori o pari al 2%, ad eccezione del sitosterolo, il cui CV è pari a 9.9%. Nella **Tabella 5.4.** sono riassunti il recupero apparente di ogni composto, il corrispondente coefficiente di variazione percentuale e la percentuale di recupero, misurata secondo la formula riportata in *Quantificazione* (pag.29).

La precisione del metodo è rappresentata da CV che risulta inferiore al 6%.

Tabella 5.4: valore medio della quantità di ciascun analita calcolato per le tre repliche della soluzione di riferimento, CV e recupero %.

	Recupero apparente (%)	CV	Recupero %
Coprostanolo	92.3	1.5	43.2
Epi-coprostanolo	101.0	1.5	45.1
Sitosterolo	108.0	5.7	48.3
Stigmastanolo	111.5	0.3	43.7

L'accuratezza in termini di recupero apparente viene valutata in questo caso confrontando la quantità di ogni analita calcolata rispetto alla quantità aggiunta all'inizio della procedura, pari a 100 ng assoluti a meno del bianco.

Considerando i valori di **Tabella 5.4.**, la quantità di ciascun composto ottenuta risulta entro il 12% del valore vero, indice di accuratezza della misura.

I risultati ricavati dal calcolo della percentuale di recupero sono dovuti principalmente alla perdita degli analiti che si verifica durante l'evaporazione del solvente tramite *Turbovap*® II, come è stato evidenziato in *Riduzione del volume tramite Turbovap*® II, pag. 54.

5.4.1.2. Applicazione del metodo su un sedimento certificato

Non essendo disponibile un materiale di sedimento certificato per gli steroidi, allo scopo di confrontare eventualmente i risultati ottenuti con altri laboratori, il metodo è stato

applicato su un sedimento certificato per composti inorganici (ERM-CC580), per indagare le *performances* analitiche in una matrice reale tracciabile.

La metodica è applicata a 1g di sedimento, aggiungendo prima della fase estrattiva 100 ng assoluti di standard interno, colesterolo-25,26,27-¹³C₃ e, successivamente al processo di derivatizzazione, 100 ng assoluti di colesterolo-3,4-¹³C₂, utilizzato come standard di recupero. Sono eseguite con tale procedura tre repliche, e, per confronto, vengono acquisiti al GC-MS i cromatogrammi di tre repliche della *soluzione standard*, su cui non è applicato il metodo.

In **Tabella 5.5.** sono indicati i valori del rapporto dell'area dello ione qualificatore, rispetto a quella dello ione target, calcolati per le tre repliche della metodica eseguita sulla matrice certificata, e di CV.

Tabella 5.5.: calcolo del rapporto tra le aree dello ione qualificatore e lo ione target e CV per le tre repliche del sedimento certificato.

Sedimento certificato					Soluzione standard	
Ione Q / ione T	ESP. 1	ESP 2	ESP.3	CV	media	CV
COP	1.87	1.88	1.78	3.0	1.70	1.8
e-COP	0.73	0.79	0.78	4.6	0.78	1.4
SITO	4.76	4.63	4.59	1.9	5.76	2.3
STIGMA	0.19	0.19	0.19	1.4	0.18	1.8

La presenza di eventuali interferenti viene valutata confrontando i risultati di **Tabella 5.5.** del sedimento certificato con quelli misurati per la soluzione standard. Poiché le misure riportate nelle due tabelle non differiscono significativamente, è possibile

affermare che la caratterizzazione del picco di ogni analita non viene interferita da altre molecole. Il coefficiente di variazione percentuale, inoltre, calcolato con i valori del rapporto tra gli ioni sia per il sedimento certificato sia per la soluzione standard, è compreso tra 1.4 e 4.6%, evidenziando che il picco cromatografico non è interferito.

Il calcolo della concentrazione, del coefficiente di variazione percentuale e del recupero percentuale di ciascun composto, è riassunto *Tabella 5.6.*

Tabella 5.6.: valore medio della concentrazione di ciascun analita calcolato per le tre repliche del sedimento certificato, CV e recupero %.

	$\langle \text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \rangle$	CV	Recupero %
Coprostanolo	1437.7	6.1	58.0
Epi-coprostanolo	509.5	6.1	58.1
Colesterolo	2453.3	3.6	58.2
Sitosterolo	163.6	3.0	57.9
Stigmastanolo	181.2	7.8	58.0

La determinazione della quantità di steroidi presenti nella matrice certificata è stata eseguita con una buona precisione, come evidenziano i valori di CV.

5.4.1.3. Applicazione del metodo su un sedimento fluviale

In questo paragrafo, la precisione viene valutata applicando il metodo proposto su un sedimento con caratteristiche compositive, chimico-fisiche e origine differenti rispetto a quelle delle matrici trattate in precedenza.

In particolare è preso in esame un campione prelevato nel fiume Piave a 3,5 km di distanza da un sito probabilmente contaminato, per determinare la concentrazione di steroli e stanoli presenti. La procedura, descritta in *Applicazione del metodo su un sedimento certificato*, è eseguita su 1g di sedimento, prelevato nella frazione della carota avente profondità di circa 20-30 cm. La valutazione della presenza di interferenti, che possono causare identificazione e quantificazione errata delle molecole indagate, è eseguita confrontando il rapporto tra le aree dello ione qualificatore e lo ione target calcolato per il sedimento fluviale, con i risultati ottenuti per la soluzione standard, su cui non è applicato il metodo. La **Tabella 5.7.** riporta i valori calcolati.

Tabella 5.7.: calcolo del rapporto tra le aree dello ione qualificatore e lo ione target e CV per le tre repliche del sedimento fluviale.

Sedimento fluviale					Soluzione standard	
Ione Q / ione T	ESP. 1	ESP 2	ESP.3	CV	media	CV
COP	1.66	1.54	1.59	3.6	1.66	3.0
e-COP	0.62	0.58	0.58	3.3	0.77	0.4
SITO	5.32	5.29	5.62	3.3	5.39	3.2
STIGMA	0.17	0.17	0.17	1.4	0.17	0.3

Osservando che i valori dei rapporti tra i due ioni caratteristici, riportati nelle due tabelle, non differiscono significativamente, è possibile escludere la presenza di molecole interferenti.

Nella **Tabella 5.8.** sono indicate il valore medio della concentrazione di ciascun composto calcolato per le tre repliche del sedimento fluviale, la precisione della misura e la percentuale di recupero.

Tabella 5.8.: valore medio della concentrazione di ciascun analita, CV e recupero %.

	<ng•g⁻¹>	CV	Recupero %
Coprostanolo	52.8	15.9	56.7
Epi-coprostanolo	15.3	9.0	58.1
Colesterolo	1023.5	10.4	52.2
Sitosterolo	1656.6	8.9	53.2
Stigmastanolo	1045.4	11.3	53.1

Il calcolo della concentrazione degli steroidi presenta coefficienti di variazione percentuale compresi tra 8-16 %.

Dalla determinazione della quantità di coprostanolo ed epi-coprostanolo, emerge che nel sito esaminato questi steroidi sono presenti in basse concentrazioni, rispetto agli altri composti (**Tabella 5.8.**).

Allo scopo di verificare l'accuratezza del metodo analitico, la procedura è applicata a 1g del sedimento impiegato nell'esperienza precedente, il quale è stato fortificato con 100 ng assoluti di questi due steroli.

L'elaborazione dei dati, riportata in **Tabella 5.9.**, prevede il calcolo della concentrazione del coprostanolo e dell'epi-coprostanolo, la precisione e l'accuratezza, calcolata secondo la formula riportata in *Quantificazione* (pag.30).

Figura 5.9.: misura della concentrazione di COP ed e-COP nelle tre repliche del sedimento fluviale fortificato e dell'accuratezza.

	ESP 1	ESP 2	ESP 3	CV	ACCURATEZZA
	ng•g⁻¹	ng•g⁻¹	ng•g⁻¹		
Coprostanolo	168.8	162.3	177.3	4.4	13.6 %
Epi-coprostanolo	127.3	121.1	118.5	3.7	10.7 %

I valori dell'errore relativo percentuale, calcolato per il coprostanolo e l'epi-coprostanolo, a cui sono stati sottratti i valori dei corrispondenti analiti già presenti nella matrice e considerando la propagazione dell'errore, indicano che il metodo sviluppato presenta un'accuratezza soddisfacente.

Dai risultati positivi ottenuti in tutte le esperienze descritte in *Determinazione della precisione e dell'accuratezza del metodo*, sono state verificate e confermate la precisione e l'accuratezza della procedura proposta.

6. RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1. Applicazione del metodo su campioni di origine fluviale

In questo paragrafo è descritta l'applicazione del metodo analitico proposto in un contesto ambientale. In particolare viene eseguita un'indagine qualitativa e quantitativa degli steroidi in alcuni campioni di sedimento, prelevati lungo il fiume Piave, ai quali si è fatto riferimento in *Campioni* (pag. 32).

Il primo campione indagato è situato in prossimità di un sito potenzialmente contaminato e sono studiate due frazioni della carota campionata: la più superficiale (0-10 cm) e la più profonda (20-30 cm). Il secondo sedimento analizzato costituisce la frazione con profondità 0-10 cm ed è stato prelevato 3 m a valle dal suddetto sito.

Affinché lo studio del luogo di campionamento presenti maggior completezza, i risultati dei due campioni sono confrontati con quelli ottenuti dall'esame del sedimento prelevato a 3.5 km a monte dal sito potenzialmente contaminato, riportati in *Applicazione del metodo su un sedimento fluviale* (pag. 92).

In **Tabella 6.1.** sono indicate le abbreviazioni con cui successivamente verranno indicati i campioni fluviali indagati.

Tabella 6.1.: campioni fluviali su cui è applicato il metodo e corrispondenti abbreviazioni.

Campione	Abbreviazione
Frazione con profondità 0-10 cm, campionata in prossimità del sito potenzialmente contaminato.	S_{SC}^{sup}
Frazione con profondità 20-30 cm, campionata in prossimità del sito potenzialmente contaminato.	S_{SC}^{pr}
Frazione con profondità 0-10 cm, campionata 3 m a valle dal sito potenzialmente contaminato.	S_{VALLE}^{sup}
Frazione con profondità 0-10 cm, campionata 3.5 km a monte dal sito potenzialmente contaminato.	S_{MONTE}^{pr}

Di seguito viene riportata l'elaborazione dei dati che prevede il calcolo del rapporto tra le aree dello ione qualificatore e dello ione target per ciascun analita, **Tabella 6.2.**, e della concentrazione degli steroidi presenti nei sedimenti presi in esame, **Tabella 6.3.**

Tabella 6.2.: calcolo del rapporto dell'area dello ione qualificatore rispetto a quella dello ione target per ogni sedimento fluviale studiato. Tra parentesi CV.

Ione Q / ione T Sedimento fluviale	S_{SC}^{sup}	S_{SC}^{pr}	S_{VALLE}^{sup}	S_{MONTE}^{pr}
Coprostanolo	1.75 (3%)	1.78 (4%)	1.72 (5%)	1.64 (3%)
Epi-coprostanolo	0.80 (15%)	0.77 (12%)	0.60 (14%)	0.59 (15%)
Sitosterolo	5.26 (14%)	5.88 (1%)	5.55 (5%)	5.56 (5%)
Stigmastanolo	0.15 (11%)	0.16 (13%)	0.15 (7%)	0.16 (16%)

Come è possibile osservare dai valori del coefficiente di variazione percentuale, che affianca ogni misura, i risultati sono confrontabili con quelli ottenuti per la soluzione standard di ciascuna molecola, riportati in *Spettrometria di massa (Tabella 4.1.)*. Tale aspetto evidenzia l'assenza di possibili interferenti presenti nel campione che comportano la quantificazione imprecisa dei composti.

Tabella 6.3.: determinazione della quantità di steroidi presente nei sedimenti studiati.

Concentrazione (ng)	S_{SC}^{sup}	S_{SC}^{pr}	S_{VALLE}^{sup}	S_{MONTE}^{pr}
Coprostanolo	77.0 ± 3.1	116.7 ± 16.3	178.8 ± 5.7	52.8 ± 8.0
Epi-coprostanolo	7.2 ± 0.6	34.9 ± 3.5	11.9 ± 0.9	15.3 ± 1.4
Colesterolo	117.1 ± 7.0	288.4 ± 11.5	191.7 ± 17.2	1023.5 ± 102.3
Sitosterolo	76.3 ± 7.6	363.4 ± 69.0	191.8 ± 9.6	1656.3 ± 132.5
Stigmastanolo	25.7 ± 2.6	121.7 ± 8.5	67.3 ± 4.7	1045.4 ± 115.0

Confrontando le concentrazioni degli analiti determinate nella frazione più superficiale del campione prelevato in prossimità del sito contaminato, S_{sc}^{sup} , con quelle della frazione più profonda della stessa carota, S_{sc}^{pr} , è evidente che la quantità di steroidi è maggiore nel secondo caso, causata, probabilmente, dalla deposizione delle particelle nel fondale.

Per quanto riguarda i valori di coprostanolo ed epi-coprostanolo misurati nel campione prelevato 3 m a valle dal sito stesso, S_{valle}^{sup} , essi risultano superiori a quelli del S_{sc}^{pr} , probabilmente a causa del trasporto dovuto alla corrente del fiume e alla marea.

Nel sedimento campionato a 3.5 km dalla probabile fonte di inquinamento, S_{monte}^{pr} , le concentrazioni di coprostanolo e di epi-coprostanolo sono piuttosto basse, in accordo con la maggiore distanza dal sito contaminato. Le quantità degli altri biomarcatori, invece, risultano molto maggiori rispetto a quelle riscontrate nelle altre frazioni, soprattutto per quanto riguarda il sitosterolo, la cui elevata concentrazione può essere determinata da fonti ambientali e biologiche, in quanto tale molecola è di origine vegetale.

L'interpretazione dei risultati ottenuti è stata approfondita facendo riferimento ai rapporti tra le concentrazioni degli analiti, riportati nell'*Introduzione* (pag. 9): in questo modo è possibile stabilire se il sito indagato risulta inquinato e la probabile fonte di inquinamento.

In **Tabella 8.4.** sono riportati i parametri impiegati per risalire a un'indagine più precisa delle condizioni ambientali in cui si trovano i siti indagati.

Tabella 8.4.: parametri impiegati per l'interpretazione dei risultati ottenuti dall'analisi di quattro sedimenti fluviali.

	COP / STIGMA	COP / COL	COP / e-COP
S_{SC}^{sup}	3.00	0.65	10.7
S_{SC}^{pr}	1.37	0.40	0.47
S_{VALLE}^{sup}	2.66	0.93	15.0
S_{MONTE}^{pr}	0.03	0.05	3.4

In accordo con i valori di riferimento indicati a pagina 9 dell'*Introduzione*, è possibile valutare la condizione ambientale dei siti analizzati. In particolare, il campione S_{SC}^{sup} risulta inquinato e la fonte della contaminazione è antropica o suina, dato che il valore del rapporto tra la concentrazione del coprostanolo rispetto a quella del stigmastanolo risulta compresa tra 1.5 e 5.5 [41]. Si ha conferma di questa indicazione anche dai risultati ottenuti dagli altri due parametri: il rapporto tra le concentrazioni di coprostanolo e colesterolo, infatti, mostra valori maggiori di 0.2, che indica che l'inquinamento ha origine antropica. Questo aspetto si è riscontrato anche con l'ultimo parametro che relaziona il coprostanolo e l'epi-coprostanolo, in quanto un rapporto maggiore a 2.5 indica che il sedimento presenta inquinamento antropico [30], [41].

Tali considerazioni trovano corrispondenza anche nel sedimento S_{VALLE}^{sup} la cui contaminazione può essere dovuta dal trasporto dei contaminanti da parte della corrente del fiume o della marea.

Assenza di inquinamento si osserva nella frazione più profonda della carota campionata in prossimità della fonte di inquinamento, S_{SC}^{PF} : tutti i parametri calcolati, infatti, evidenziano che la presenza delle molecole studiate è dovuta a un contributo biologico. Il contributo biologico e ambientale si osserva anche nella frazione del campione S_{MONTE}^{PF} , in cui i parametri COP / STIGMA e COP / COL evidenziano un sedimento non inquinato, essendo i valori inferiori a 0.3 e 1, rispettivamente [41].

7. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Questa trattazione ha descritto la messa a punto di un metodo analitico che è stato utilizzato per indagare alcuni traccianti caratteristici delle attività umane quali gli steroidi fecali. Gli steroidi oggetto di studio, infatti, sono dei biomarcatori che possono essere impiegati per ricostruire gli *input* antropogenici nell'ambiente. L'analisi qualitativa e quantitativa di questi composti lungo il profilo verticale del sedimento determina la loro distribuzione, che può eventualmente contribuire ad integrare informazioni riguardo ad eventi di carattere paleoambientale e/o archeologico, accaduti migliaia di anni fa. Il monitoraggio di questi composti riveste un ruolo fondamentale anche per quanto riguarda l'identificazione e la stima dell'inquinamento dovuto alla materia fecale, che, se non tempestivamente trattata, può provocare danni all'ambiente e alla salute umana.

Lo sviluppo di una procedura caratterizzata da una buona precisione e accuratezza ha richiesto lo svolgimento di alcune indagini preliminari in cui sono state studiate e ottimizzate le condizioni operative delle diverse fasi del metodo analitico. Preliminarmente, per ciascun composto sono stati acquisiti gli spettri di massa e scelti due ioni, utili per la determinazione quantitativa e qualitativa degli steroidi, di cui è possibile ottenere un cromatogramma con la loro completa separazione, grazie alla ottimizzazione del metodo cromatografico. Successivamente, un particolare sforzo è stato dedicato all'ottimizzazione delle fasi di estrazione, purificazione e riduzione del volume che ha consentito di ottenere i risultati descritti in questo lavoro di tesi.

Del metodo analitico proposto sono stati valutati i parametri caratteristici. Analizzando al GC-MS soluzioni standard dei composti presenti in concentrazioni crescenti, è stato

possibile constatare che vi è linearità tra il segnale acquisito dallo strumento e la concentrazione degli steroidi. Dal calcolo dei limiti di rivelabilità e di quantificazione strumentali si sono determinati, rispettivamente, i seguenti valori per ciascun analita: COP 30 e 100 pg/ μ L, e-COP 70 e 240 pg/ μ L, SITO 20 e 60 pg/ μ L, STIGMA 70 e 220 pg/ μ L. Infine, dall'analisi dei bianchi procedurali si è rilevato che la concentrazione di coprostanolo, epi-coprostanolo e stigmastanolo risulta inferiore ai limiti di rivelabilità e di quantificazione strumentali, mentre le concentrazioni di sitosterolo e colesterolo sono superiori ai due parametri.

La validazione del metodo è stata eseguita determinando precisione e stimando accuratezza attraverso differenti approcci in diverse matrici. I valori di precisione e accuratezza si attestano, rispettivamente, tra il 3% e il 6% tra il 13% e il 10%, a seconda dell'analita considerato.

Il metodo analitico è stato applicato a tre campioni di sedimento prelevati lungo il fiume Piave. I parametri ottenuti hanno consentito di stabilire l'entità dell'inquinamento e fare ipotesi sulla fonte di contaminazione. Un ulteriore confronto è stata eseguito tra i livelli superficiali e quelli più profondi dei campioni, allo scopo di valutare eventuali evoluzioni temporali dell'apporto di materia fecale.

MATERIALE SUPPLEMENTARE

Tabella 9.1.: condizioni sperimentali impiegate per registrare gli spettri di massa delle soluzioni degli standard- Spettrometria di massa, pag.34.

HP-5 5% Phenyl Methyl Siloxan, 325 °C: 30 m x 250 µm x 0.25 µm

Helium Flow: 1.4 mL/min

Inlet Temperature: 280°C

Oven Program: 150°C for 1 min
Then 20°C/min to 310°C for 6 min

Post Run: 10 min

MS Source: 230 C maximum 300 C

Ms Quad: 150 C maximum 200 C

Ionization Energy: 70 ev

Solvent Delay: 8 min

Tabella 9.2.: condizioni sperimentali impiegate per registrare il cromatogramma della soluzione standard di stigmastanolo- *Spettrometria di massa*, pag.39.

HP-5 5% Phenyl Methyl Siloxan, 325 °C: 30 m x 250 µm x 0.25 µm

Helium Flow:	1.4 mL/min
Inlet Temperature:	280°C
Oven Program:	150°C for 1 min Then 20°C/min to 310°C for 6 min
Post Run:	5 min
MS Source:	230 C maximum 300 C
Ms Quad:	150 C maximum 200 C
Ionization Energy:	70 ev
Solvent Delay:	8 min

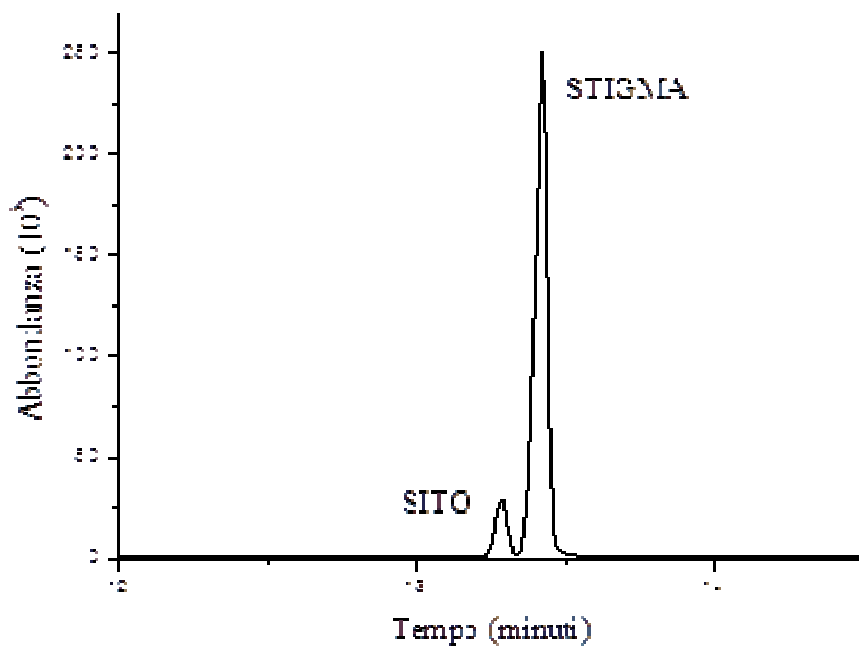


Figura 9.1.: cromatogramma della soluzione standard del stigmastanolo, con impurezza di sitosterolo- *Spettrometria di massa*, pag. 39.

Tabella 9.3.: condizioni sperimentali impiegate per registrare il cromatogramma della soluzione standard – *Metodo cromatografico*, pag.40.

HP-5 5% Phenyl Methyl Siloxan, 325 °C: 30 m x 250 µm x 0.25 µm	
Helium Flow:	1 mL/min
Inlet Temperature:	280°C
Oven Program:	150°C for 1 min Then 20°C/min to 300°C for 6 min Then 3°C/min to 305°C for 10 min
Post Run:	10 min, 310 °C
MS Source:	230 C maximum 300 C
Ms Quad:	150 C maximum 200 C
Ionization Energy:	70 ev
Solvent Delay:	8 min

Tabella 9.4.: *ottimizzazione delle condizioni sperimentali che consentono la separazione di tutti gli analiti e che sono state impiegate per registrare il cromatogramma della soluzione standard – Metodo cromatografico, pag.44.*

HP-5 5% Phenyl Methyl Siloxan, 325 °C: 60 m x 250 µm x 0.25 µm

Helium Flow:	1 mL/min
Inlet Temperature:	280°C
Oven Program:	70°C for 2 min Then 20°C/min to 220°C for 0 min Then 2°C/min to 300°C for 10 min
Post Run:	10 min, 305 °C
MS Source:	230 C maximum 300 C
Ms Quad:	150 C maximum 200 C
Ionization Energy:	70 ev
Solvent Delay:	8 min

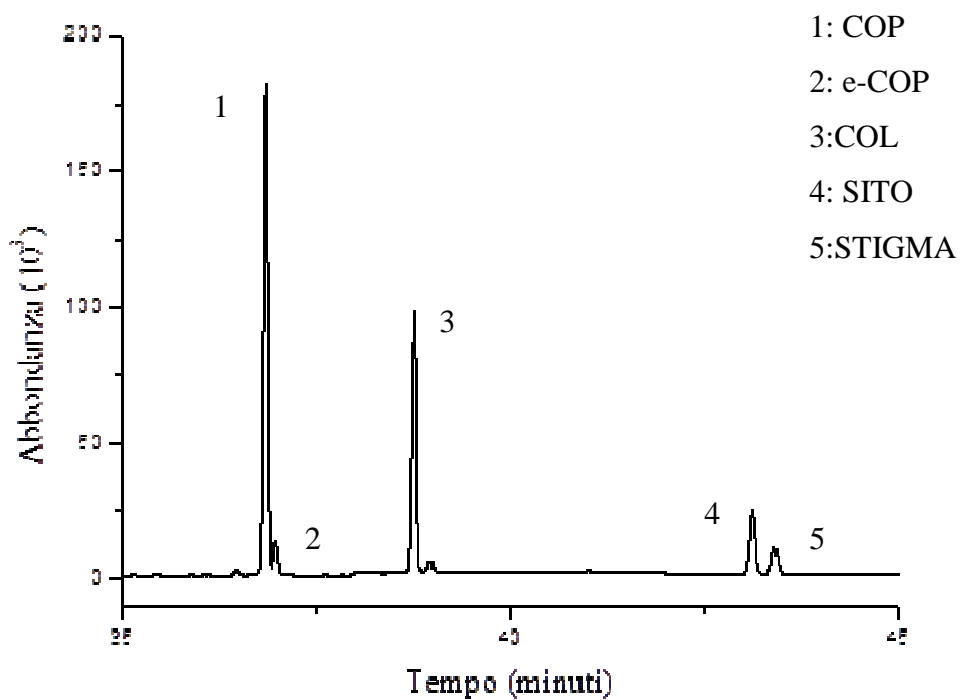


Figura 9.2.: cromatogramma della frazione più superficiale della carota campionata in prossimità di un allevamento-*Risultati e discussione*, pag.95.

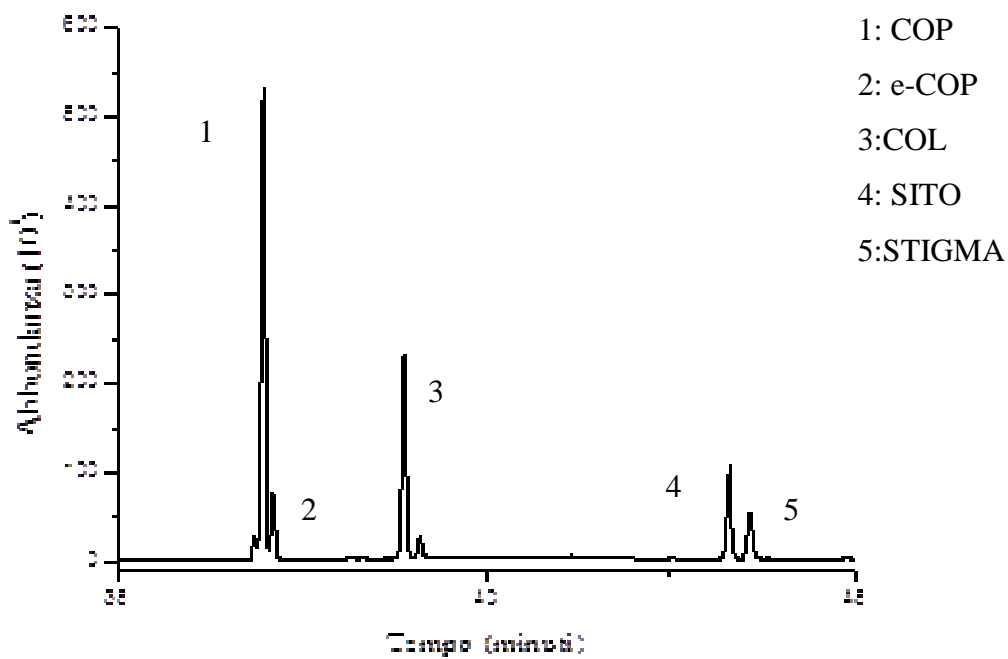


Figura 9.3.: cromatogramma della frazione più profonda della carota campionata in prossimità di un allevamento-*Risultati e discussione*, pag.92.

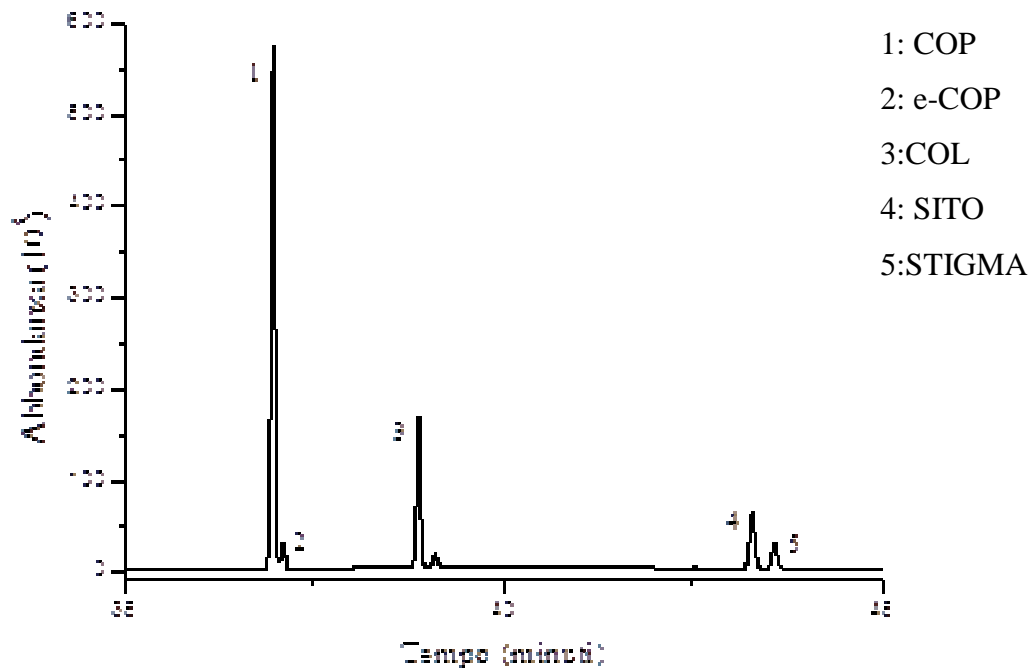


Figura 9.3.: cromatogramma della frazione più superficiale della carota campionata 3 metri a valle da un allevamento-Risultati e discussione, pag.95.

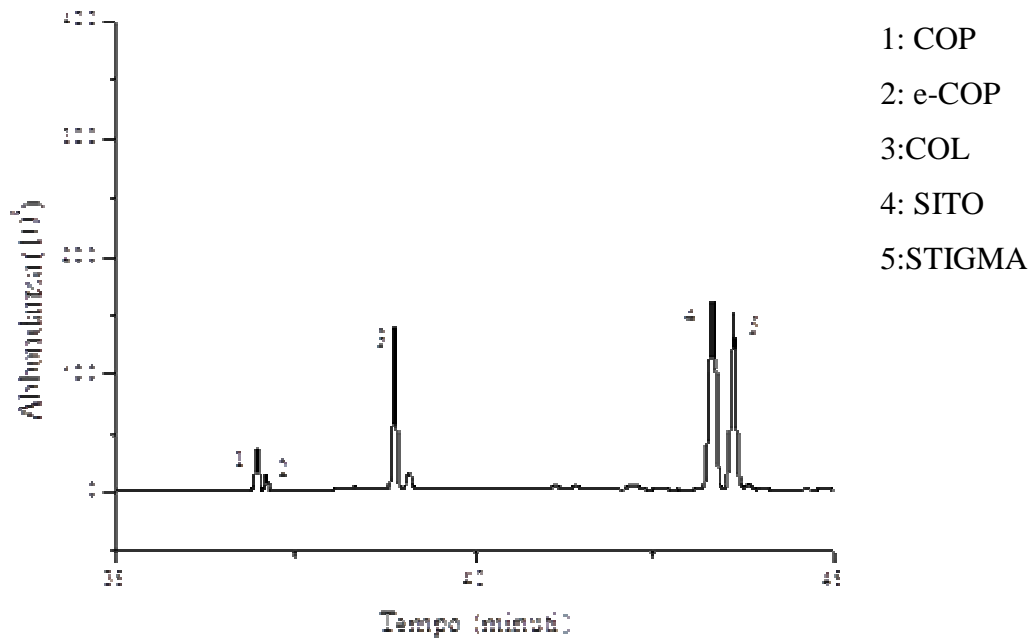


Figura 9.4.: cromatogramma della frazione più profonda della carota campionata 3.5 km a monte da un allevamento-Risultati e discussione, pag.95.

Tabella 9.5.: riferimento ai valori critici del parametro F , calcolato per eseguire il Test F di Fisher.

		$F_{0.05}(v_1, v_2)$										
		Gradi di libertà del numeratore v_1										
v_2	v_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
Gradi di libertà del denominatore v_2	1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88	243.91
	2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41
	3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74
	4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91
	5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68
	6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00
	7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57
	8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28
	9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07
	10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91
	11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79
	12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69
	13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60
	14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53
	15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48
	16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42
	17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38
	18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34
	19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31
	20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28
	21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25
	22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23
	23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20
	24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18
	25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16
	26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15
	27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13
	28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12
	29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10
	30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	
50	4.03	3.18	2.79	2.56	2.40	2.29	2.20	2.13	2.07	2.03	1.95	
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	
80	3.96	3.11	2.72	2.49	2.33	2.21	2.13	2.06	2.00	1.95	1.88	
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	

BIBLIOGRAFIA

1. Brucher, T., Brovkin, V., Kloster, S., Marlon, J.R., Power, M.J., *Comparing modeling fire dynamics with charcoal records for the Holocene*. *Climate of the Past*, 10 (2) (2014) 811-824
2. D'Anjou, R.M., Bradley, R.S., Balascio, N.L. Finkelstein, D.B., *Climate impacts on human settlement and agricultural activities in northern Norway revealed through sediment biogeochemistry*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50) (2012) 20332-20337
3. Group, P.G., Sciences, A., Fluminense, U.F., *Evaluating levoglucosan as an indicator of biomass burning in Caraja's, Amazonia: A comparison to the charcoal record*, 65 (2), (2001) 267-272
4. Kirchgeorg, T., Schupbach, S., Kehrwald, N., McWethy, D.B., e Barbante, C., *Method for the determination of specific molecular markers of biomass burning in lake sediments*. *Organic Geochemistry*, 71, (2014) 1-6
5. Schmidt F., Oberhänsli H., Wilkes H., *Biocoenosis to hydrological variability in Southern Africa during the last 84 ka BP: a study of lipid biomarkers and compound-specific stable carbon and hydrogen isotopes from hypersaline Lake Tswaing*. *Global and Planetary change* 112, (2014) 92-104
6. Tse, T.J., Codling, G., Jones, P.D., Thomas, K., Liber, K., Giesy, J.P., Doig, L.E., *Reconstructing longterm trend in municipal sewage discharge into a small lake in northern Manitoba, Canada*. *Chemosphere*, 103, (2014) 299-305
7. Timothy I., Englinton, Geoffrey Englinton, *Molecular proxies for paleoclimatology*, *Earth and Planetary Science letters*, 275, (2008) 1-16
8. de Abreu-Mota M.A., de Moura Barboza C.A., Bicego M.C., Martins C.C., *Sedimentary biomarkers along a contamination gradient in a human-impacted sub-estuary in Southern Brazil. A multi-parameter approach based on spatial and seasonal variability*. *Chemosphere* 103 (2014) 156-163.
9. Wen-Yen, H., Meinschein, W., *Sterols as source indicators of organic materials in sediments*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 40 (3), (1976) 323-330.
10. Leeming, R. Ball, A. Ashbolt, N. Jones, G. Nichols, P., *Distinguishing between human and animal sources of faecal pollution*, *Australian Journal of Chemistry*, 61, (1994) 434-435
11. Biache C., Philp P.R., *The use of sterol distributions combined with compound specific isotope analyses as a tool to identify the origin of fecal contamination in rivers.*, *Water Research* 47 (2013) 1201-1208.

12. Hatcher, P. G., e McGillivray, P. A. *Sewage contamination in the New York Bight. Coprostanol as an indicator*. Environmental Science and Technology, 13(10), (1979) 1225–1229
13. Murtaugh J.J. Bunch R.L., *Sterols as a measure of fecal pollution*. Journal of Water Pollution Control, 39, (1967) 404–409
14. Chapman, P.M., Wang, F., Janssen, C., Persoone, G., e Allen, H.E., *Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: Binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 55(10), (1998) 2221-2243
15. Dureth, S., Hermann, R., e Pecher, K., *Tacing faecal pollution by coprostanol and intestinal bacteria in an ice-covered Finnish lake loaded with both industrial ad domestic sewage*. Water, Air, and Soil Pollution, 28 (1-2), (1986) 131-149.
16. Birk, J.J., Dippold, M., Wiesenberg, G.L.B., e Glaser, B. *Combined quantification of faecal sterols, stanols, stanones and bile acids in soils and terrestrial sediments by gaschromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 1241 (2012) 1-10.
17. Hjulström B., Isaksson S., *Identification of activity area signatures in a reconstructed Iron Age house by combining element and lipid analyses of sediments.*, Journal of Archaeological Science 36, (2009) 174-183
18. Froehner, S., Maceno, M., e Martins, R.F. *Sediments as a potential tool for assessment of sewage pollution in Barigui River, Brazil*. Environmental Monitoring and Assessment, 170 (1-4), (2010) 261-72
19. Vane, C.H., Kim, a W., McGowan, S., Leng, M.J., Heaton, T.H.E., Kendrick, C.P., Swann, G.E.a., *Sedimentary records of sewage pollution using faecal markers in contrasting peri-urban shallow lakes*. The Science of the Total Environment, 409(2), (2010) 345-56
20. Bull, I.D., Lockheart, M.J., Elhmmali, M.M., Roberts, D.J., e Evershed, R.P. *The origin of faeces by means of biomarker detection*. Environment International, 27 (8) (2002), 647-54
21. Fahrenfeld N., *fecal coliform source identification using traces*. Master of Science thesis, south Carolina, USA, Graduate School of Clemson University (2008)

22. Rogge W.F., Medeiros P.M., Simoneit B.R.T., *Organic marker compounds for surface soil and fugitive dust from open lot dairies and cattle feedlots*, Atmospheric Environment 40, (2005) 27-49
23. Grimalt, J.O., Fernandez, P., Bayona, J.M., e Albaiges, J. *Assessment of fecal sterols and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal waters*. Environmental Sciences and Technology, 24(3), (1990) 357-363
24. Humrawali N., Latif M.T., Masni M.A., *Phytosterols composition in surface sediment in Kuala Selangor, Selangor, Malaysia*. European Journal of Scientific Research, 33, (2009) 187-194
25. Patton D., Reeves A.D., *Sterol concentrations and temporal variations on the north shore mudflats of the firth of Tay, Scotland*. Marine Pollution Bulletin, 38, (1999) 613-618
26. Martins, C.C., Aguiar, S.N., Wisnieski, E., Ceschim, L.M.M., Figueira, R.C.L., e Montone, R.C. *Baseline concentrations of faecal sterols and assessment of sewage input into different inlets of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica*. Marine Pollution Bulletin, 78(1-2), (2014) 218-23
27. Kawakami, S. K., Montone, R. C. Oceanogr, I., e S, U. De. *An Efficient Ethanol-Based Analytical Protocol to Quantify Faecal Steroids in Marine Sediments*, Journal of the Brazilian Chemical Society 13(2), (2002) 226-232
28. Ogura, K., Machihara, T. e Takada, H., *Diagenesis of biomarkers in Biwa Lake sediments over 1 million years*. Organic Geochemistry, 16(4-6), (1990) 805-813
29. Szucs, S., Sarvary, A., Cain, T., e Adany, R., *Method validation for the simultaneous determination of fecal sterols in surface waters by gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatographic and Science, 44(2), (2006) 70-6
30. Fernandes M.B., Sicre M.-A., Cardoso J.N., Macêdo, *Sedimentary 4-desmethyl sterols and n-alkanols in a eutrophic urban estuary, Capibaribe River, Brazil*. The Science of the total Environment, 231, (1999) 1-16
31. Benfenati E., Cools E., Fattore E., Fanelli R., *A GC-MS method for the analysis of fecal and plant sterols in sediment samples*. Chemosphere 7 (1994) 1393-1405
32. Cordeiro, L.G.S.M., Carreira, R.S., e Wagener, A.L.R. *Geochemistry of fecal sterols in a contaminated estuary in southern Brazil*. Organic Geochemistry, 39(8), (2008) 1097-1103
33. Sojinu, S. O., Sonibare, O. O., Ekundayo, O., e Zeng, E. Y., *Assessing anthropogenic contamination in surface sediments of Niger Delta, Nigeria with*

- fecal sterols and n-alkanes as indicators*. The Science of the Total Environment, 441, (2012) 89–96
34. Grilo, C. F., Neto, R. R., Vicente, M. a., de Castro, E. V. R., Figueira, R. C. L., e Carreira, R. S. *Evaluation of the influence of urbanization processes using mangrove and fecal markers in recent organic matter in a tropical tidal flat estuary*. Applied Geochemistry, 38, (2013) 82–91
 35. Kwok, W. H., Leung, D. K. K., Leung, G. N. W., Tang, F. P. W., Wan, T. S. M., Wong, C. H. F., e Wong, J. K. Y., *Unusual observations during steroid analysis. Rapid Communications in Mass Spectrometry*. RCM, 22(5) (2008) 682–6
 36. Bethell, P.H., Goad, L.J., Evershed, R.P. e Ottaway, J., *The Study of Molecular Markers of Human Activity: The Use of Coprostanol in the Soil as an Indicator of Human Faecal Material*. Journal of Archaeological Science 21 (1994) 629-632
 37. C., W.C.L. *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments: Terrestrial Algal and Siliceous Indicators* Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 3 (2001) 75-97
 38. Canuel, E.A., e Martens, C.S. *Reactivity of recently deposited organic matter: Degradation of lipid compounds near the sediment-water interface*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 60(10) (1996) 1973-1806
 39. Evershed, R.P., e Bethell, P.H. *Application of Multimolecular Biomarker Techniques to the Identification of Fecal Material in Archaeological Soils and Sediments*. ACS Symposium Series, 625, (1996) 157-172
 40. Guimaraes, J. T. F., Souza-Filho, P. W. M., Alves, R., de Souza, E. B., da Costa, F. R., Reis, L. S., Dall’Agnol, R. *Source and distribution of pollen and spores in surface sediments of a plateau lake in southeastern Amazonia*. Quaternary International. (2014)
 41. . Jiang, C., Alexander, R., Kagi, R. I., e Murray, A. P. *Polycyclic aromatic hydrocarbons in ancient sediments and their relationships to palaeoclimate*. Organic Geochemistry, 29(5-7), (1998) 1721–1735
 42. Rychlik. (n.d.). *Fortification of Foods with Vitamins*, First Edition. Edited by Michael Rychlik. © 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA. Published 2011 by Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA. *Stable Isotope Dilution Assays in Vitamin Analysis – A Review of Principles and Applications*
 43. Takada, H., Farrington, J. W., Bothner, M. H., Johnson, C. G., e Tripp, B. W., *Transport of sludge-derived organic pollutants to deep-sea sediments at Deep Water Dump Site.*, Environmental Science and Technology 28 (1994) 1062–1072

44. Venkatesan, M. I., e Santiago, C. A., *Sterols in ocean sediments: Novel tracers to examine habitats of cetaceans, pinnipeds, penguins and humans*. *Marine Biology* 102 (1989) 431–437
45. Wardroper, A. M. K., Maxwell, J. R., e Morris, R. J., *Sterols of a diatomaceous ooze from Walvis Bay*. *Steroids*, 32(2), (1978) 203–221.