

5000 - COSTITUENTI ORGANICI

La determinazione del materiale organico nelle acque può essere effettuata attraverso due differenti tipi di misure:

- misure adatte alla quantificazione di sostanze aventi caratteristiche comuni;
- misure adatte alla quantificazione di singole sostanze.

Premesso che la determinazione di singole sostanze non ha bisogno di particolari commenti, occorre precisare che alcuni parametri, come ad esempio il carbonio organico e la richiesta chimica di ossigeno, possono essere utilizzati per stabilire la quantità totale di sostanze organiche presenti.

Di queste, una frazione importante è rappresentata dalla richiesta biochimica di ossigeno, che può essere impiegato come indice del materiale organico biodegradabile.

Altri parametri, come i grassi e oli animali e vegetali e gli idrocarburi totali, rappresentano le sostanze organiche estraibili con solvente non polare, a loro volta separabili mediante passaggio su colonna impaccata di gel di silice.

I metodi descritti in questa sezione prevedono l'impiego delle seguenti tecniche:

- spettrofotometria di assorbimento molecolare nella regione del visibile;
- spettrofotometria infrarossa;
- gascromatografia;
- gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa;
- cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC);
- volumetria;
- potenziometria.

Queste tecniche sono ampiamente descritte nella parte generale (Sezione 1020), dove sono anche riportati i metodi di campionamento e conservazione dei campioni (Sezione 1030).

Esistono molte raccomandazioni sull'uso in sicurezza di strumentazione analitica e di reattivi di laboratorio. Data la diversità di tipologie e modelli di strumenti e l'elevato numero di reattivi utilizzati nei singoli metodi proposti in questa sezione del manuale, non è possibile in questa sede operare una lista di tutte le possibili avvertenze. Pertanto, si rimanda alla consultazione dei manuali d'uso dei singoli strumenti e delle schede di sicurezza dei singoli reattivi nonché alla lettura delle frasi di rischio riportate sulle etichette degli imballaggi delle sostanze e preparati utilizzati.

Solo in alcuni casi particolari si è provveduto ad esplicitare, all'interno del singolo metodo, particolari avvertenze sulla sicurezza d'uso della strumentazione e dei reattivi. Comunque tutte le operazioni analitiche devono essere effettuate nel rispetto delle disposizioni stabilite dalla normativa sulla sicurezza nei luoghi di lavoro.

5010. Aldeidi (Composti carbonilici)

Introduzione

I composti carbonilici sono inquinanti di rilevante interesse ambientale in quanto vengono generati durante i processi di ossidazione. Nelle acque naturali e di scarico, questi composti possono essere prodotti dalla foto-degradazione del materiale organico disciolto e possono essere rilasciati come metaboliti di processi microbiologici. Recentemente, i composti carbonilici di basso peso molecolare hanno ricevuto particolare attenzione in quanto è stata dimostrata la loro formazione durante i processi di disinfezione e di ossidazione.

Diversi composti carbonilici sono pericolosi per la salute umana anche quando sono presenti nelle acque a basse concentrazioni. In particolare è stato dimostrato che la formaldeide è un composto mutageno e carcinogeno mentre il gliossale può indurre tumori allo stomaco.

Nel seguito vengono descritti tre procedimenti analitici per il dosaggio di detti composti nelle acque.

Il primo (Metodo A) si basa sulla reazione di aldeidi alifatiche con il cloridrato di 3-metil-2-benzotiazolone idrazone (MBTH) e cloruro ferrico, con formazione di un derivato di colore blu, la cui assorbanza è misurata alla lunghezza d'onda di 628 nm.

Il secondo (Metodo B1) consiste in una preventiva derivatizzazione dei composti carbonilici, estrazione liquido-solido dei composti derivatizzati ed analisi successiva in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).

Il terzo (Metodo B2) consiste in una derivatizzazione dei composti carbonilici, estrazione liquido-liquido dei composti derivatizzati ed analisi in gascromatografia.

A differenza dei metodi cromatografici, il metodo spettrofotometrico soffre di notevoli limitazioni:

- non è adatto, per la sua scarsa sensibilità, alla determinazione di aldeidi in tracce;
- come tutti i metodi aspecifici, è scarsamente accurato e tende generalmente a sovrastimare il contenuto di aldeidi nel campione;
- non è in grado di distinguere aldeidi con diversa tossicità e quindi risulta inadatto a valutare l'impatto di questi composti sull'ambiente.

Tale metodo può essere impiegato, tuttavia, in valutazioni preliminari ("screening") sul contenuto di aldeidi in un campione acquoso o per caratterizzare effluenti a composizione chimica nota. Pertanto, limitatamente a questi ambiti di applicazione, si è ritenuto opportuno mantenere detto metodo.

Per una valutazione più accurata degli effetti di questi composti sull'ambiente si deve ricorrere all'impiego dei metodi cromatografici precedentemente indicati.

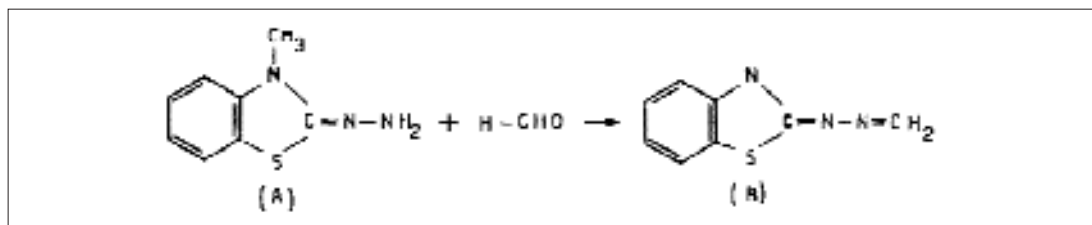
METODO A – Determinazione spettrofotometrica mediante cloridrato di 3-metil-2-benzotiazolone idrazone (MBTH)

1. Principio del metodo

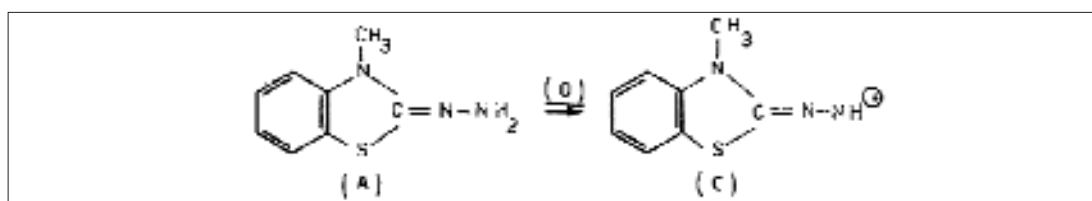
Le aldeidi alifatiche idrosolubili presenti nelle acque vengono determinate per reazione con il cloridrato di 3-metil-2-benzotiazolone idrazone (MBTH) e cloruro di ferro (III) con formazione di un derivato di colore blu.

Il meccanismo di reazione, applicato alla formaldeide, è il seguente:

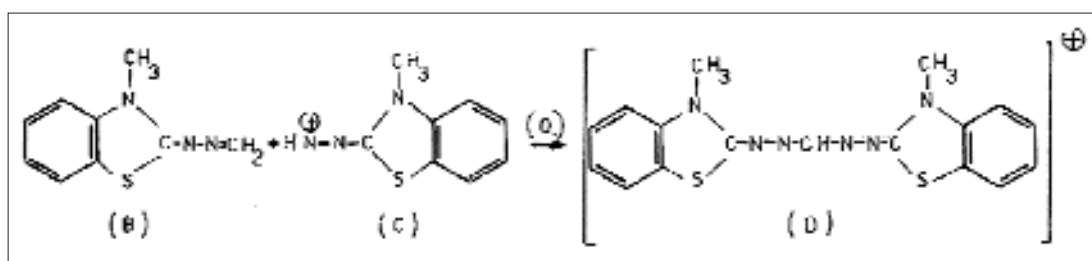
a) Reazione dell'aldeide con l'idrazona A (MBTH) per formare l'azina B.



b) Ossidazione della parte A che non ha reagito per formare il reattivo cationico C.



c) Reazione fra B e C con formazione del catione condensato D di colore blu.



Il catione colorato (D) presenta in soluzione acquosa due massimi di assorbimento: il primo a circa 625 nm, il secondo intorno a 665 nm.

Come per la determinazione dello stesso parametro nell'aria, si è ritenuto opportuno adottare la lunghezza d'onda di 628 nm.

L'assorbimento molare varia da composto a composto; è più elevato per le prime quattro aldeidi della serie alifatica e per queste la variazione è minima.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione 0,05-1 mg/L. Concentrazioni superiori possono essere rilevate diluendo il campione.

3. Interferenze e cause d'errore

Interferiscono ammine aromatiche, composti imminoeterociclici, carbazoli, stilbeni, coloranti azoici, basi di Schiff.

4. Conservazione del campione

Il campione deve essere conservato in bottiglia di vetro scuro, completamente piena e tappata, mantenuta alla temperatura di circa +4°C. Il campione va analizzato entro 48 ore dal prelievo.

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro* munito di celle aventi cammino ottico di 1 cm.

5.2 *Normale attrezzatura di laboratorio*

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere del tipo puro per analisi e l'acqua distillata o deionizzata.

6.1 *Soluzione di MBTH (P.M. 215,7) allo 0,05%*

Sciogliere 0,5 g di cloridrato di 3-metil-2-benzotiazolone idrazone (MBTH) in 1000 mL di acqua.

Questa soluzione non deve essere colorata e se torbida va filtrata.

Il reattivo conservato in bottiglie di vetro scuro, alla temperatura di 4°C, è stabile una settimana.

6.2 *Soluzione ossidante*

Sciogliere 16,0 g di acido solfamminico ($\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$) e 10,0 g di $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 1000 mL di acqua.

La soluzione è stabile almeno un mese, se conservata a 4°C.

6.3 *Soluzione di Dimedone*

Sciogliere 1,07 g di dimedone (5,5-Dimetilcicloesan-1,3-dione) in acqua e diluire a 500 mL.

6.4 *Soluzione di riferimento di formaldeide (1000 mg/L di HCHO)*

Diluire 2,7 mL di una soluzione di formaldeide al 37-39% in peso a 1000 mL con acqua.

Il controllo del titolo viene eseguito con le seguenti modalità: introdurre in tre palloni da 100 mL 3 aliquote di 50 mL di soluzione di dimedone (6.3) ed aggiungere in ognuno di essi 10 mL della soluzione di riferimento di formaldeide (6.4). Agitare bene, tappare e lasciare a riposo almeno una notte a temperatura ambiente. Filtrare attraverso crogioli a setto poroso (tipo Gooch) precedentemente pesati. Seccare i precipitati sotto vuoto a 70°C (o a temperatura ambiente su P_2O_5) fino a peso costante.

Il titolo della soluzione (6.4) si ricava dalla seguente formula:

$$C = \frac{P \cdot 0,1027 \cdot 1000}{V}$$

dove:

C = concentrazione (mg/L);

P = peso (mg) del precipitato (valore medio di tre determinazioni);

0,1027 = fattore gravimetrico di conversione in formaldeide;

V = volume (mL) di soluzione di riferimento utilizzata.

6.5 *Soluzione intermedia di formaldeide (100 mg/L di HCHO)*

Introdurre 10 mL di soluzione di riferimento (6.4) in un matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con acqua.

6.6 Soluzione diluita di formaldeide (1 mg/L di HCHO)

Introdurre 10 mL della soluzione intermedia (6.5) in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua (1 mL=1 µg di HCHO)

7. Procedimento

7.1 Taratura

Prelevare 1 mL; 2 mL; 4 mL; 8 mL e 10 mL di soluzione diluita (6.6), corrispondenti a 1 µg; 2 µg; 4 µg; 8 µg e 10 µg di HCHO, ed introdurli in cilindri graduati da 25 mL, portando a volume di 10 mL con acqua. Aggiungere 10 mL di soluzione MBTH (6.1), miscelare e dopo 1 ora aggiungere 5 mL della soluzione ossidante (6.2). Preparare secondo le stesse modalità, ma senza la soluzione diluita (6.6), una quinta soluzione di taratura (bianco).

Attendere almeno 5 minuti per consentire lo sviluppo completo del colore e misurare allo spettrofotometro le assorbanze delle soluzioni alla lunghezza d'onda di 628 nm usando celle da 1 cm di cammino ottico.

Riportare in grafico i valori di assorbanza delle soluzioni, corrette del valore del bianco, in corrispondenza dei µg di HCHO, tenendo conto delle correzioni ricavate dal controllo gravimetrico.

7.2 Dosaggio del campione

In cilindri tarati da 25 mL introdurre 10 mL di campione o una sua aliquota diluita a 10 mL e procedere come descritto al Paragrafo 7.1.

8. Calcoli

Per calcolare la concentrazione di aldeidi nel campione utilizzare la seguente formula:

$$C = \frac{a}{V}$$

dove:

C = concentrazione (mg/L) di aldeidi;

a = quantità di aldeidi (µg) ricavata dalla curva di taratura;

V = volume (mL) di campione analizzato.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=7) da un singolo laboratorio su campioni di acqua di scarico contenenti 300 µg/L di HCHO hanno fornito un coefficiente di variazione [CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100] pari all'1% e un'accuratezza del 30%.

METODI B – Determinazioni cromatografiche**B1 – Determinazione mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)****1. Principio del metodo**

Il metodo si basa su una derivatizzazione dei composti carbonilici nella fase acquosa mediante reazione con dinitro-fenil-idrazina (DNPH) e successiva estrazione liquido-solido, su cartucce SPE ("solid phase extraction"), dei composti derivatizzati. I composti carbonilici derivatizzati contenuti nell'estratto organico concentrato vengono separati e rilevati mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata ad una rivelazione spettrofotometrica nell'ultravioletto (UV).

L'analisi qualitativa dei singoli composti è basata sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi ottenuti nel cromatogramma del campione con quelli ottenuti da idonee miscele di riferimento. La determinazione quantitativa dei vari composti viene effettuata con le aree dei rispettivi picchi cromatografici sulla base di opportune rette di taratura di miscele di riferimento. I risultati sono di norma espressi in $\mu\text{g/L}$, per ciascun composto carbonilico.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque superficiali, sotterranee e di scarico e consente la determinazione dei composti carbonilici riportati in Tab. 1.

Tabella 1: Composti carbonilici analizzabili con il presente metodo

	Composto
1	acetaldeide
2	acetone
3	acroleina
4	benzaldeide
5	butanale
6	crotonaldeide
7	cicloesanone
8	decanale
9	2,5-dimetilbenzaldeide
10	formaldeide
11	eptanale
12	esanale
13	gliosale
14	isovalerialdeide
15	nonanale
16	ottanale
17	pentanale
18	propanale
19	m-tolualdeide
20	o-tolualdeide
21	p-tolualdeide

Per le acque superficiali e di scarico il metodo presenta un limite di rilevabilità, per ciascun composto carbonilico, inferiore a $10 \mu\text{g/L}$.

3. Interferenze e cause di errore

Normali interferenti possono essere quei composti organici che danno luogo, durante l'analisi cromatografica, a picchi con tempi di ritenzione coincidenti con quelli dei composti in esame. Solventi, reattivi, vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro ed ogni trattamento del campione possono causare la presenza di picchi interferenti e/o alterazioni della corrente di fondo del rivelatore con conseguenti difficoltà d'interpretazione del tracciato cromatografico.

Pertanto, al fine di essere sicuri che tutti i materiali utilizzati siano esenti da interferenze nelle condizioni operative adottate è buona norma, sia all'inizio dell'indagine che periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi" sostituendo al campione acqua distillata. Nel caso di evidenza d'interferenze, individuarne la provenienza analizzando ogni singolo passaggio della procedura e procedere alla loro eliminazione. Può essere richiesta una specifica selezione dei reattivi ed una purificazione dei solventi mediante distillazione.

Particolare attenzione deve essere rivolta alla formaldeide in quanto essendo ormai ubiquitario nell'ambiente può contaminare il derivatizzante. Qualora questo venga accertato, si consiglia di utilizzare una nuova confezione di derivatizzante o di purificarlo per cristallizzazione. La vetreria da utilizzare non deve venire in contatto con acetone e con metanolo, che possono reagire con il derivatizzante dando luogo a composti interferenti.

4. Campionamento e conservazione del campione

I campioni vengono prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, con chiusura a smeriglio oppure a vite con guarnizione di teflon. Non filtrare l'acqua ed evitare ogni operazione che faciliti la perdita dei composti organici volatili disciolti. Riempire la bottiglia fino all'orlo e tappare subito evitando di lasciare spazi gassosi nei quali possono passare i componenti più volatili che vanno perduti all'apertura della bottiglia, dando risultati in difetto.

Le analisi devono essere effettuate al più presto e in ogni caso non oltre 48 ore dopo il prelievo del campione, conservando questo in frigorifero a 4°C nel periodo d'attesa.

5. Apparecchiature

5.1 HPLC

Si consiglia l'uso di uno strumento dotato di rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile, o a serie di diodi (DAD), impostato a 360 nm e di colonna a fase inversa. La fase mobile è costituita da una miscela di acetonitrile/acqua o metanolo/acqua. L'analisi viene effettuata in gradiente la cui composizione e durata, così come il flusso di lavoro, dipende dal tipo e dalle dimensioni della colonna utilizzata.

5.2 Adsorbenti per l'estrazione SPE

Per l'estrazione liquido-solido si consiglia di utilizzare cartucce costituite da materiale polimerico, con fase stazionaria polare o di materiale siliceo con fase stazionaria C₁₈ o C₈. La quantità di materiale adsorbente dipenderà dal tipo di cartucce utilizzate. La procedura di condizionamento, estrazione ed eluizione viene effettuata sotto vuoto montando la cartuccia su una beuta da vuoto o su un sistema per estrazione liquido-solido disponibile in commercio, secondo le modalità consigliate dal produttore delle cartucce.

5.3 "Vial"

Flaconcini di vetro ("vials") di idonea capacità con tappo a vite e guarnizione in silicone teflonata.

5.4 Bilancia tecnica, risoluzione 0,1 g.

5.5 *Bilancia analitica, risoluzione 0,1 mg.*

5.6 *Normale vetreria di laboratorio*

Dopo il lavaggio e prima dell'uso, la vetreria deve essere sciacquata con acqua bidistillata ed asciugata in stufa.

6. Reattivi

6.1 *Acetonitrile o metanolo (per HPLC)*

6.2 *Acqua (per HPLC)*

6.3 *NaOH 6 M*

6.4 *HCl 6 M*

6.5 *Soluzione di 2,4-dinitro-fenilidrazina (DNPH)*

Sciogliere 428,7 mg di DNPH al 70% in 100 mL di acetonitrile.

6.6 *Tampone citrato 1 M, pH=3*

Miscelare 80 mL di una soluzione di acido citrico 1 M con 20 mL di una soluzione di citrato di sodio 1 M e aggiustare il pH con NaOH.

6.7 *Soluzioni di composti carbonilici*

Sono disponibili in commercio delle soluzioni multicomponente di alcuni composti carbonilici derivatizzati con DNPH. Queste soluzioni, essendo vendute con certificato d'analisi, possono essere utilizzate come riferimenti primari. Le soluzioni di riferimento per la taratura, a concentrazione di circa 0,1-10 mg/L vengono ottenute per diluizioni successive delle soluzioni di riferimento concentrate impiegando come solvente la fase mobile usata nell'analisi HPLC.

Le soluzioni concentrate dei rimanenti composti carbonilici si preparano pesando esattamente una quantità di circa 100 mg in un matraccio tarato (100 mL) e portando a volume con acqua o acetonitrile. Queste soluzioni possono essere conservate a 4°C per un mese. Le soluzioni di riferimento, a concentrazione di circa 0,005-10 mg/L, vengono ottenute per diluizioni successive delle soluzioni concentrate impiegando come solvente acqua e derivatizzate come per il campione. È preferibile che le soluzioni di riferimento siano preparate e derivatizzate giornalmente.

7. Procedimento

7.1 *Trattamento preliminare*

Se il campione è stato refrigerato, prima dell'estrazione farlo riequilibrare a temperatura ambiente. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire una migliore omogeneità.

7.2 *Derivatizzazione con DNPH*

In una beuta introdurre 50 mL di campione acquoso e aggiungere 2 mL di tampone citrato. Portare il pH a 3 con HCl o NaOH. Aggiungere 3 mL di soluzione di DNPH, chiudere la beuta e riscaldare a 40°C per 1 ora tenendo la soluzione in agitazione.

Condizionare la cartuccia SPE come suggerito dal produttore. Far passare quantitativamente il volume di soluzione dopo averla lasciata raffreddare. Seccare la cartuccia sotto vuoto, o con azoto, ed eluire le aldeidi derivatizzate con 6 mL di acetonitrile. Portare il volume dell'estratto a 2 mL sotto moderato flusso d'azoto. Eseguire l'analisi in HPLC-UV a 360 nm. La separazione di tutti i composti carbonilici di Tab. 1 in un'unica analisi risulta abbastanza problematica a causa della co-eluzione di alcuni di essi. Se necessario si possono utilizzare due colonne in serie per migliorare la separazione dei vari componenti o, alternativamente, si possono effettuare due analisi, la prima ottimizzata alla separazione dei composti con tempi di ritenzione più piccoli, la seconda ottimizzata alla separazione dei composti con tempi di ritenzione più grandi.

La Fig. 1 mostra una tipica separazione di alcuni composti carbonilici con questa procedura.

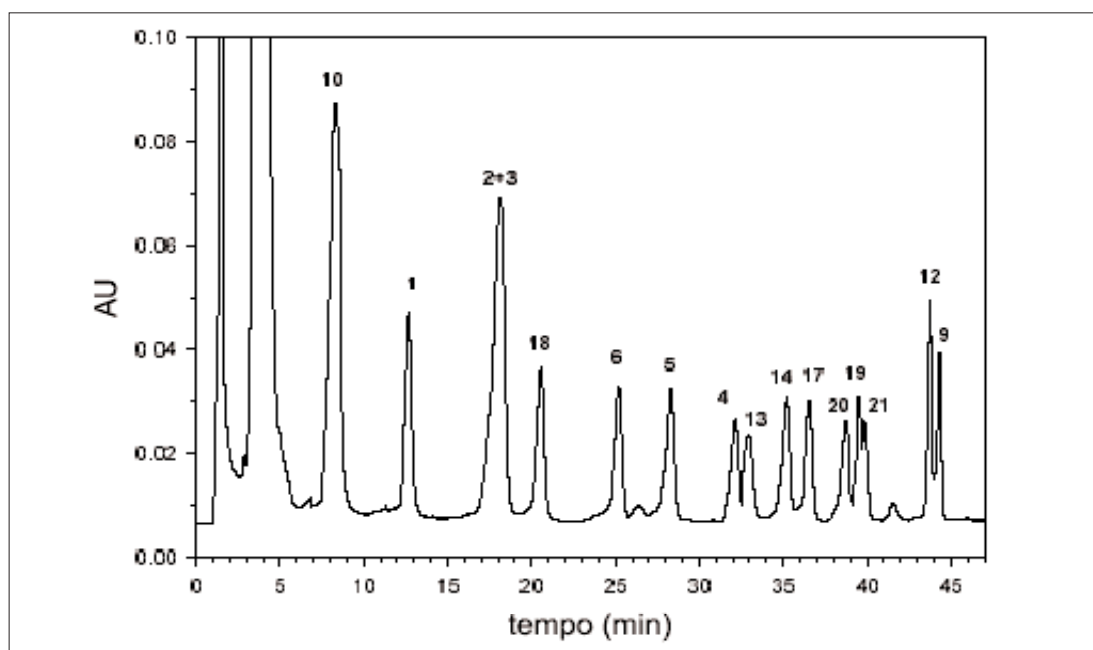


Figura 1: Cromatogramma ottenuto mediante derivatizzazione ed estrazione con cartucce SPE Bondelut C18 da 1 g di un campione di acqua di scarico contaminato con 100-150 ppb di alcuni composti carbonilici di Tab. 1. Condizioni analitiche: colonna cromatografica Supelcosil LC-18 250x3 mm, dimensione particelle 5 μm , volume iniettato 10 μL , flusso 0,7 mL/min, rivelazione 360 nm. Gradiente (acqua/acetonitrile): 60/40 da 0 a 7 min, 40/60 a 40 min, 30/70 a 41 min.

8. Calcoli

Introdurre nel cromatografo liquido volumi uguali di campione e di soluzioni di riferimento. Preparare almeno 3 miscele di composti carbonilici (6.7) ad opportune concentrazioni. Costruire quindi le rette di taratura per i singoli composti, accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento, riportando in grafico l'area del picco del componente (A) in funzione della concentrazione del componente stesso e interpolando i punti sperimentali con il metodo dei minimi quadrati. Ricavare il coefficiente angolare (a) e l'intercetta (b) della retta di taratura. La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

$$C = \frac{A - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:

C = concentrazione ($\mu\text{g/L}$) di aldeidi;

A = area del picco del composto nella miscela incognita;

b = valore dell'intercetta della retta di taratura;

α = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
 V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
 V_i = volume (mL) del campione acquoso.

9. Qualità del dato

Le iniezioni del campione e delle soluzioni di riferimento vanno ripetute almeno due volte al fine di migliorare l'accuratezza delle misure sperimentali. La ripetibilità dell'analisi viene verificata ripetendo per 10 volte l'analisi di una delle soluzioni di riferimento. L'impiego di soluzioni multicomponente di alcuni composti carbonilici già derivatizzati ha permesso di stabilire che i recuperi sono superiori all'80% con un coefficiente di variazione del 12%.

Nota: si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".

Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

METODO B2 – Determinazione mediante gascromatografia

1. Principio del metodo

Il metodo si basa su una derivatizzazione dei composti carbonilici nella fase acquosa mediante reazione con O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-idrossilammina idrocloruro (PFBHA-HCl) e successiva estrazione liquido-liquido (LLE). I composti carbonilici derivatizzati contenuti nell'estratto organico concentrato vengono separati e rilevati mediante gascromatografia (GC) accoppiata ad un rivelatore a cattura di elettroni (ECD).

L'analisi qualitativa dei singoli composti è basata sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi ottenuti nel cromatogramma del campione con quelli ottenuti da idonee miscele di riferimento. La determinazione quantitativa dei vari composti viene effettuata con le aree dei rispettivi picchi cromatografici sulla base di opportune rette di taratura di miscele di riferimento. I risultati sono di norma espressi in $\mu\text{g/L}$, per ciascun composto carbonilico.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque superficiali, sotterranee e di scarico e consente la determinazione dei composti carbonilici riportati in Tab. 1 (vedi Metodo B1).

Per le acque superficiali e di scarico il metodo presenta un limite di rilevabilità, per ciascun composto carbonilico, inferiore a $10 \mu\text{g/L}$.

3. Interferenze e cause di errore

Normali interferenti possono essere quei composti organici che danno luogo, durante l'analisi cromatografica, a picchi con tempi di ritenzione coincidenti con quelli dei composti in esame. Solventi, reattivi, vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro ed ogni trattamento del campione possono causare la presenza di picchi interferenti e/o alterazioni della corrente di fondo del rivelatore con conseguenti difficoltà d'interpretazione del tracciato cromatografico.

Pertanto, al fine di essere sicuri che tutti i materiali utilizzati siano esenti da interferenze nelle condizioni operative adottate è buona norma, sia all'inizio dell'indagine che periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi" sostituendo al campione acqua distillata. Nel caso di evidenza d'interferenze, individuarne la provenienza analizzando ogni singolo passaggio della procedura e procedere alla loro eliminazione. Può essere richiesta una specifica selezione dei reattivi ed una purificazione dei solventi mediante distillazione. Particolare attenzione deve essere rivolta alla formaldeide in quanto essendo ormai ubiquitario nell'ambiente può contaminare il derivatizzante. Qualora questo venga accertato, si consiglia di utilizzare una nuova confezione di derivatizzante o di purificarlo per cristallizzazione. Si deve evitare che la vetreria da utilizzare venga in contatto con acetone in quanto questo solvente reagisce con il derivatizzante dando luogo a composti interferenti.

4. Campionamento e conservazione del campione

I campioni vengono prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, con chiusura a smeriglio oppure a vite con guarnizione di teflon. Non filtrare l'acqua ed evitare ogni operazione che faciliti la perdita dei composti organici volatili disciolti. Riempire la bottiglia fino all'orlo e tappare subito evitando di lasciare spazi gassosi nei quali possono passare i componenti più volatili che vanno perduti all'apertura della bottiglia, dando risultati in difetto. Le analisi devono essere effettuate al più presto e in ogni caso non oltre 48 ore dopo il prelievo del campione, conservando questo in frigorifero a 4°C nel periodo d'attesa.

5. Apparecchiature

5.1 Gascromatografo

Si consiglia l'uso di un gascromatografo dotato di iniettore "splitless" o "on-column", colonna capillare di vetro o silice fusa di media polarità, di opportuna lunghezza e diametro interno, e di rivelatore ECD. Si consiglia l'uso di un elaboratore di dati cromatografici per la misura delle aree dei picchi con possibilità di stampa di dati e cromatogrammi. L'analisi viene effettuata in "programmata di temperatura" le cui caratteristiche e durata, così come il flusso del gas di trasporto, dipendono dal tipo e dalle dimensioni della colonna utilizzata.

5.2 "Vial"

Flaconcini di vetro ("vials") di idonea capacità con tappo a vite e guarnizione in silicone teflonata.

5.3 Bilancia tecnica, risoluzione 0,1 g.

5.4 Bilancia analitica, risoluzione 0,1 mg.

5.5 Normale vetreria di laboratorio

Dopo il lavaggio e prima dell'uso, la vetreria deve essere sciacquata con acqua bidistillata ed asciugata in stufa.

6. Reattivi

6.1 *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-idrossilammina idrocloruro (PFBHA-HCl)

Preparare una soluzione 1 g/L in acqua.

6.2 Tiosolfato di sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 M

6.3 *n*-Esano puro per analisi

6.4 Acido solforico 0,1 M e 18 M

6.5 Solfato di sodio anidro (Na_2SO_4)

6.6 Elio o idrogeno puri per gas cromatografia usati come gas di trasporto, eventualmente passati attraverso una trappola a carbone attivo e una trappola a setacci molecolari. Un'ulteriore purificazione può essere fatta tramite passaggio in una trappola per l'eliminazione delle tracce d'ossigeno.

6.7 Soluzioni di riferimento di composti carbonilici

6.7.1 Soluzioni concentrate

Le soluzioni concentrate si preparano pesando una quantità di circa 100 mg di ognuno dei composti carbonilici di Tab. 1, trasferendola in un matraccio tarato (100 mL) e portando a volume con acqua o metanolo. Queste soluzioni possono essere conservate a 4°C per un mese.

6.7.2 Soluzioni diluite

Le soluzioni diluite, a concentrazione di circa 0,005-10 mg/L, vengono ottenute per diluizioni successive delle soluzioni di riferimento (6.7.1) impiegando come solvente acqua e derivatizzate come per il campione. È preferibile che dette soluzioni siano preparate e derivatizzate giornalmente.

7. Procedimento

7.1 *Trattamento preliminare*

Se il campione è stato refrigerato, prima dell'estrazione farlo riequilibrare a temperatura ambiente. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire una migliore omogeneità.

7.2 *Derivatizzazione con PFBHA-HCl*

In una "vial" introdurre 5 mL di campione acquoso, aggiungere 2 gocce di soluzione di tiosolfato 0,1 M e 0,5 mL di soluzione di PFBHA-HCl. Chiudere la beuta e agitare la soluzione per 2 ore. Aggiungere 1 goccia di soluzione di acido solforico 18 M, 1 mL di *n*-esano e agitare vigorosamente per estrarre i composti carbonilici per 2-3 minuti. Trasferire la fase di esano in un'altra "vial", aggiungere 5 mL di soluzione di acido solforico 0,1 M e agitare vigorosamente per 2-3 minuti. Trasferire la fase di esano in un'altra "vial", anidrificare con solfato di sodio ed eseguire l'analisi in GC-ECD.

La Fig. 2 mostra una tipica separazione di alcuni composti carbonilici con questa procedura.

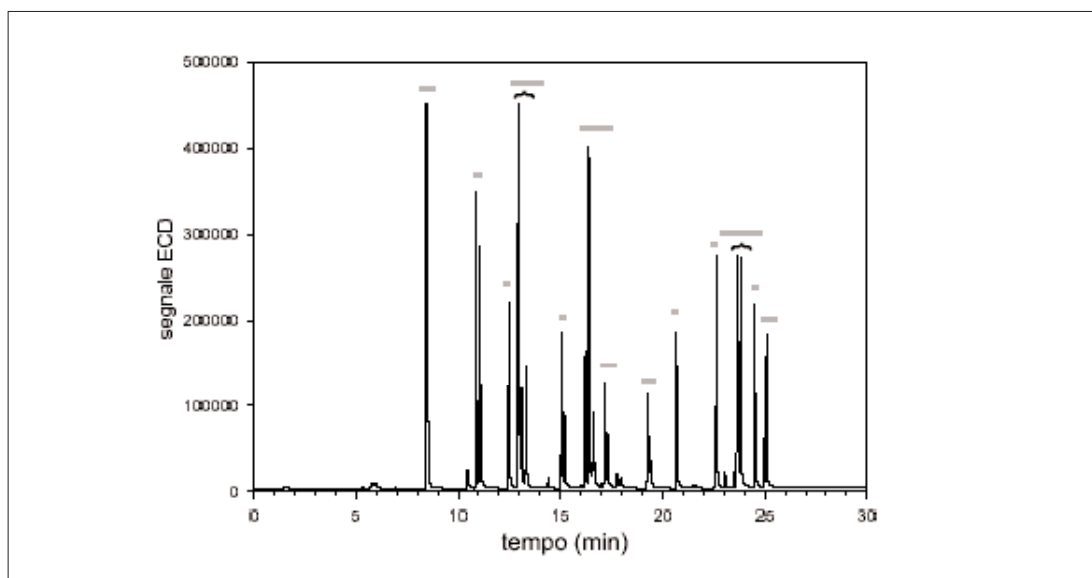


Figura 2: Cromatogramma ottenuto mediante estrazione di un campione di acqua di pozzo contaminato con 50 ppb di alcuni composti carbonilici di Tab. 1. Condizioni analitiche: colonna cromatografica Chrompack CP-Sil 60 m x 0,32 mm, spessore del film 0,25 μm , gas di trasporto idrogeno (40 cm/s), volume iniettato 1 μL . Temperatura del forno: 40°C per 1 min, 6°C/min fino a 150°C, 15°C/min fino a 280°C, isoterma per 5 min.

8. Calcoli

Introdurre nel cromatografo liquido volumi uguali di campione e di soluzioni di riferimento. Preparare almeno 3 miscele di composti carbonilici (6.7.2) ad opportune concentrazioni. Costruire quindi le rette di taratura per i singoli composti, accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento, riportando in grafico l'area del picco del componente (A) in funzione della concentrazione del componente stesso e interpolando i punti sperimentali con il metodo dei minimi quadrati. Ricavare il coefficiente angolare (a) e l'intercetta (b) della retta di taratura. La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

$$C = \frac{A - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:

C = concentrazione ($\mu\text{g/L}$) di aldeidi;

A = area del picco del composto nella miscela incognita;

b = valore dell'intercetta della retta di taratura;

a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;

V_f = volume (mL) dell'estratto finale;

V_i = volume (mL) del campione acquoso.

9. Qualità del dato

Le iniezioni del campione e delle soluzioni di riferimento vanno ripetute almeno due volte al fine di migliorare l'accuratezza delle misure sperimentali. La ripetibilità dell'analisi viene verificata ripetendo per 10 volte l'analisi di una delle soluzioni di riferimento.

Nota: si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su

materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico". Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

ALCEON CORPORATION (1993): "Overview of available information on the toxicity of drinking water disinfectants and their by-products", Cambridge, MA.

CHORUS I., KLEIN G., FASTNER J. & ROTARD W. (1992): "Off-flavors in surface waters - How efficient is bank filtration for their abatement in drinking water?" *Wat. Sci. Technol.*, **25**, (2), 251-258.

EPA (1992): "Method 8315, Determination of carbonyl compounds by high performance liquid chromatography", November 1992, Cincinnati, Ohio, USA.

EPA (1992): "Method 554, Determination of carbonyl compounds in drinking water by dinitrophenyl-hydrazine derivatization and high performance liquid chromatography", November 1992, Cincinnati, Ohio, USA.

GLAZE W.H., KOGA M. & CANCELLA D. (1989): "Ozonation by-products. 2. Improvement of an aqueous-phase derivatization method for the detection of formaldehyde and other carbonyl compounds formed by the ozonation of drinking water", *Environ. Sci. Technol.*, **23**, 838-847.

HAUSER T.R. (1965): "Determination of aliphatic aldehydes: 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride (MBTH) method. Selected methods for the measurement of air pollutants", U.S.D.H.E.W., P.H.S.

HAUSER T.R. & CUMMINGS R.L. (1964): "Increasing sensitivity of 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone test for analysis of aliphatic aldehydes in air", *Anal. Chem.*, **36**, 679.

KIEBER R.J. & MOPPER K. (1990): "Determination of picomolar concentrations of carbonyl compounds in natural waters, including seawater, by liquid chromatography", *Environ. Sci. Technol.*, **24**, 1477-1481.

KRASNER S.W., MCGUIRE M.J., JACANGELO J.G., PATANIA N.L., REAGAN K.M. & AIETA E.M. (1989): "The occurrence of disinfection by-products in US drinking water", *J. Am. Wat. Wks. Assoc.*, **81** (8), 41-53.

SAWICKI E., HAUSER T.R., STANLEY T.W. & ELBERT W. (1961): "The 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone test", *Anal. Chem.*, **33**, 93.

SCHEUPEIN R.J. (1985) In: *Advances in Chemistry 210*, V. Turoski (Ed.), American Chemistry Society, Washington, 237-245.

5020. Ammine alifatiche

Il metodo descritto consente la determinazione di mono-, di-, trimetilammina, n-propilammina, acetilammina o ammidi dell'acido acetico e cicloesilammina. In generale, la determinazione gascromatografica delle ammine presenta alcuni problemi dovuti alla elevata basicità di questi composti, superiore in qualche caso a quella dell'ammoniaca, con conseguenti problemi di eluizione in colonna.

Alcune ammine presentano inoltre elevata tensione di vapore e temperature di ebollizione inferiori alla temperatura ambiente. L'acidificazione immediata del campione, prima della determinazione mediante gascromatografia liquido-solido (GLSC) con rivelatore specifico (AFD), consente di attenuare le difficoltà insite nella procedura analitica.

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sull'estrazione, rispettivamente, con diclorometano e n-esano della componente acida e neutra eventualmente presente nel campione, sulla successiva alcalinizzazione dello stesso e sulla determinazione delle ammine mediante gascromatografia liquido-solido (GLSC) con rivelatore specifico per composti azotati (Alkali Flame Detector, AFD).

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile al di sopra delle seguenti concentrazioni riportate in Tab. 1:

Monometilammina	0,2 mg/L
Dimetilammina	0,3 mg/L
Trimetilammina	0,3 mg/L
n-Propilammina	2,5 mg/L
Cicloesilammina	0,3 mg/L
Acetilammina (ammide dell'acido acetico)	2 mg/L

3. Interferenze e cause di errore

Nelle condizioni operative di analisi possono interferire altre ammine con tempi di ritenzione simili. Le interferenze di altri composti azotati e fosforati possono essere eliminate applicando il procedimento di purificazione descritto nel Capitolo 7.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

È necessario acidificare il campione, immediatamente dopo il prelievo, con una soluzione di acido cloridrico (6.4) fino a pH 1 ($\pm 10\%$).

5. Apparecchiature

5.1 Normale vetreria di laboratorio

La vetreria deve essere accuratamente lavata e risciacquata con acqua bidistillata ed asciugata in stufa con circolazione di aria a 50°C.

5.2 Matracci da 100 mL e 250 mL

5.3 Cilindri graduati da 100 mL

5.4 Bilancia analitica con risoluzione di 0,1 mg.

5.5 Vetrini da orologio ed imbuti

5.6 Microsiringhe da 10 μ L, 25 μ L, 50 μ L, 100 μ L

5.7 Imbuti separatori da 150 mL, 250 mL

5.8 Pipette graduate da 1 mL, 5 mL, 10 mL

5.9 Pipette Pasteur

5.10 pHmetro

5.11 Microsiringa da 5 μ L per iniezione del campione e delle soluzioni di taratura.

5.12 Gascromatografo per colonne impaccate con rivelatore per composti azotati e fosforati (Alkali Flame Detector, AFD)

5.13 Sistema di registrazione e di calcolo delle aree dei picchi

5.14 Colonna impaccata in vetro (L=1,80 m; d.i.=2 mm) con 4% Carbowax 20 M+0,8% di KOH su Carbopack B 80/100 mesh (vedi nota 2)

5.15 Elio, idrogeno, ed Aria ultrapura (UPP) ulteriormente purificati con gel di silice e setacci molecolari.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono avere un grado di purezza analitica tale che una prova in bianco non dia interferenze.

6.1 Acqua bidistillata

6.2 Soluzione di riferimento di ammine (grado di purezza superiore al 98%)

Per la mono-, di- e trimetilammina è necessario utilizzare il relativo cloridrato data la loro bassa temperatura di ebollizione come ammine libere.

6.3 Soluzioni di riferimento concentrate di ammine (300 ng/ μ L)

Pesare, rispettivamente, 166 mg, 121 mg e 123 mg dei cloridrati della mono-, di- e trimetilammina. Trasferire quantitativamente ogni ammina in un matraccio da 250 mL e portare a volume con acqua bidistillata.

Pesare 76 mg di acetilammina, trasferire quantitativamente in un matraccio da 250 mL e portare a volume con acqua bidistillata.

Prelevare, rispettivamente, 88 μL e 107 μL di cicloesilammina e n-propilammina, trasferirle in un matraccio da 250 mL contenente 100 mL di acqua bidistillata, aggiungere 3-4 gocce di HCl (6.4) e portare a volume con acqua.

Per diluizioni successive delle soluzioni concentrate si preparano almeno 4 soluzioni miste di taratura all'interno del campo di indagine analitico.

6.4 *Acido cloridrico 1:4*

Aggiungere 1 volume di acido cloridrico di elevata purezza al 37% a 4 volumi di acqua bidistillata.

6.5 *Diclorometano per HPLC*

6.6 *n-Esano per HPLC*

6.7 *Sodio idrossido solido, reattivo puro per analisi.*

7. **Procedimento**

In un imbuto separatore estrarre 100 mL di campione, precedentemente acidificati con HCl (6.4) a $\text{pH}=1$ (il valore di pH 1 non è critico per cui oscillazioni del 10% non inficiano i risultati dei recuperi durante la procedura di estrazione del campione con i due solventi 6.5 e 6.6), per tre volte con 30 mL di diclorometano (6.5) e per tre volte con n-esano (6.6). Scartare gli estratti organici e alla soluzione acquosa aggiungere 1-2 pastiglie di NaOH solido (6.7) per raggiungere il valore di $\text{pH}=13$.

Data l'elevata volatilità di alcune ammine, è necessario procedere all'analisi gascromatografica del campione immediatamente dopo l'alcalinizzazione. L'analisi viene effettuata iniettando 1 μL della soluzione acquosa direttamente in colonna. Al Paragrafo 7.1 si descrivono a titolo esemplificativo, le condizioni operative tipiche dell'analisi gascromatografica e in Fig. 1 si riporta un esempio di cromatogramma di un campione di acqua di scarico.

7.1 *Condizioni gascromatografiche*

Temperatura del forno:

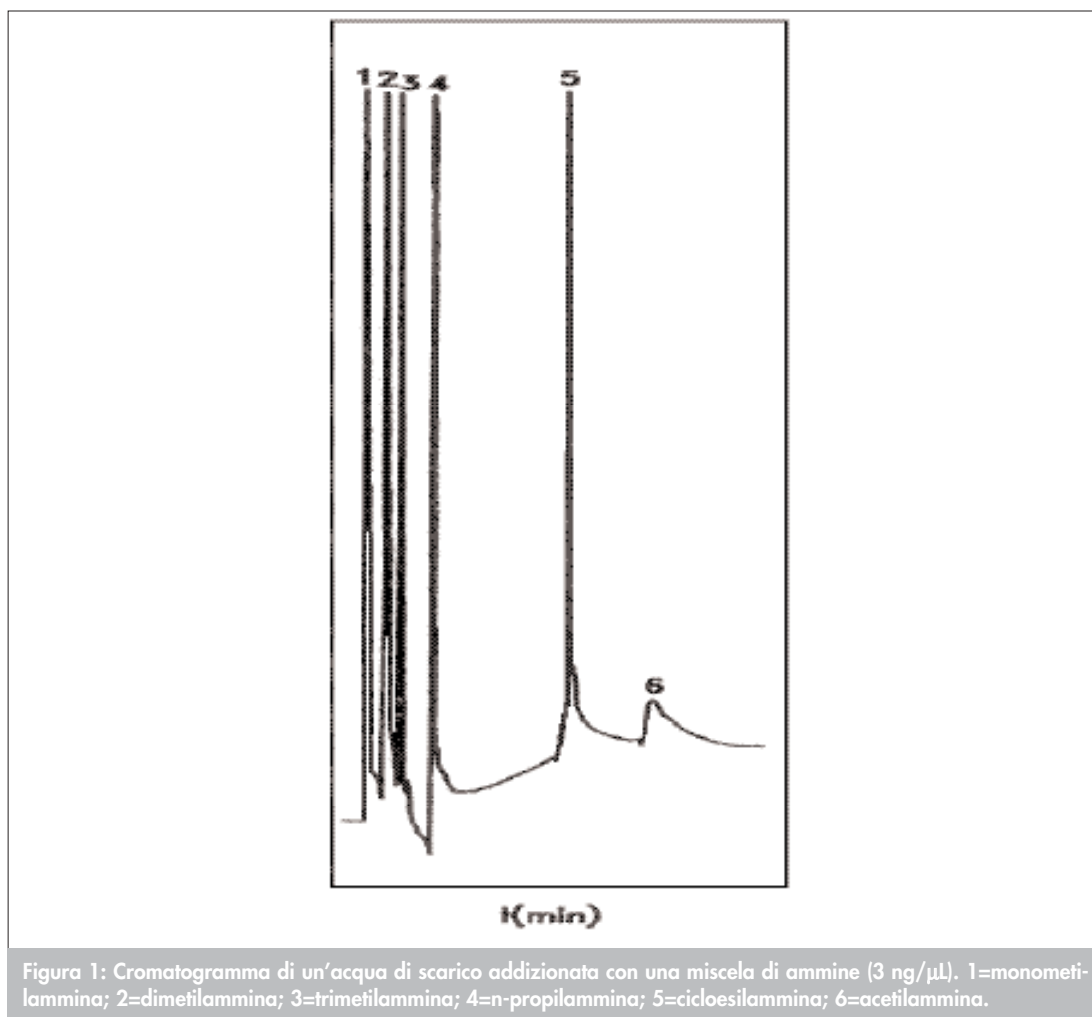
- Isoterma iniziale a 75°C per 0,5 minuti
- Gradiente di temperatura di 30°C/minuto fino a 190°C;
- Isoterma finale a 190°C per 15 minuti o fino a completa eluizione dei composti contenuti nel campione.

Rivelatore per composti azotati e fosforati (AFD):

- Temperatura 280°C (le altre condizioni operative del rivelatore vanno ottimizzate al fine di ottenere la massima sensibilità);
- Idrogeno al flusso di 3 mL/minuto
- Aria al flusso di 50 mL/minuto;
- Tensione applicata: 19 volt.

Temperatura iniettore: 250°C

Gas di trasporto: elio al flusso di 35 mL/minuto.



8. Calcoli

La concentrazione di ogni ammina viene determinata confrontando l'area del picco cromatografico relativo a ciascuna ammina nel campione con quella dell'analogo picco nella soluzione di riferimento e apportando le correzioni relative al recupero (R%) e alla diluizione del campione per l'aggiunta della soluzione di acido cloridrico (6.4).

La formula da applicare è la seguente:

$$C = \frac{A_c C_s (V_o + V_a)}{A_r R V_c}$$

dove:

C = concentrazione (mg/L) di ammina;

A_c = area del picco dell'ammina nel campione;

A_s = area del picco dell'ammina nella soluzione di riferimento;

C_s = concentrazione (mg/L) dell'ammina nella soluzione di riferimento;

V_c = volume (mL) di campione prelevato;

V_o = volume (mL) di soluzione di HCl (6.4) aggiunto;

R = recupero (%) calcolato con almeno 5 determinazioni.

9. Qualità del dato

Effettuando cinque prove su 100 mL di acqua di scarico (priva delle ammine da determinare), cui sono state aggiunte quantità note di ogni ammina in modo da realizzare concentrazioni di 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2,5 mg/L e 5 mg/L si sono ottenuti valori del coefficiente di variazione, $[CV (\%) = (\text{scarto tipo}/\text{valore medio}) \cdot 100]$, compresi tra il 2% e il 6% e recuperi compresi tra il 93% e il 97%.

Nota 1: si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico". Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

Nota 2: la preparazione e l'utilizzo della colonna gascromatografica (5.14) richiede molta attenzione in quanto il Carbopack B è particolarmente frantumabile per cui è necessario operare delicatamente durante la sua preparazione. Inoltre, dopo aver condizionato la colonna per 24 ore a 220°C, occorre iniettare 10 µL di H₂O bidistillata per almeno 30 volte. Quest'ultima operazione va ripetuta ogni volta che i picchi delle ammine non siano opportunamente separati tra loro e soprattutto se risultano scodati. È opportuno, infine, iniettare, ogni 4-5 campioni analizzati, 1 µL di acqua bidistillata per verificare l'effetto "memoria" della colonna.

BIBLIOGRAFIA

ALIDUL-RASHID M.K. et al. (1991): "Determination of volatile amines in sediment and water samples", *Anal. Chim. Acta*, **252**, (1-2) 229-236.

GREENHERG L. et al. (1992): "Determination of aliphatic amines in air by membrane enrichment directly coupled to a gas chromatograph", *Chromatographye*, **33**, (1-2), 72-82.

GREENHERG L. et al. (1992): "Measurement of aliphatic amines in ambient air and rainwater", *Chemosphere*, **24**, (10), 1533-1540.

KATOOKE H. et al. (1992): "Determination of low molecular weight aliphatic primary amines in urine as their benzene-sulfonyl derivatives by chromatography with flame photometric detection", *Biomed. Chromatogr.* **6**, (5), 72-82.

YANG X.H. et al. (1993): "Determination of nanomolar concentrations of individual dissolved low molecular weight amines and organic acids in sea water", *Anal. Chem.*, **65**, (5), 572-576.

ZHANG A.Q. et al. (1992): "Determination of trimethylamine and related aliphatic amines in human urine by head-space gas chromatography", *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **584**, (2), 141-145.

5030. Azoto organico

Per azoto organico s'intende l'azoto presente in diversi composti organici (ammine, ammidi, immine, ecc.) incluso l'azoto albuminoide. La sua presenza nelle acque è dovuta principalmente a sostanze di origine animale e vegetale, quali aminoacidi, polipeptidi e proteine. L'azoto organico può essere determinato per digestione del campione, dopo rimozione dell'ammoniaca libera, distillando l'ammoniaca formatasi nella digestione stessa e titolandola con una soluzione di riferimento di un acido minerale forte o dosandola per via spettrofotometrica. Nel caso non si ricorra alla preventiva rimozione dell'ammoniaca libera, si ottiene la misura del tradizionale azoto Kjeldahl.

Con il presente metodo non si determinano nitrati e nitriti. Inoltre, il metodo non determina l'azoto presente in azidi, azine, azocomposti, idrazoni, nitrili, nitro e nitroso composti, ossime e semicarbazoni per la cui determinazione è richiesto un trattamento del campione mediante digestione-ossidazione al persolfato.

1. Principio del metodo

L'azoto organico viene trasformato in solfato monoidrogeno di ammonio attraverso un processo di mineralizzazione, realizzato per digestione del campione con H_2SO_4 concentrato, previa aggiunta di solfato di rame, come catalizzatore, e di solfato di potassio per raggiungere un punto di ebollizione di 345° - $370^{\circ}C$. La temperatura non deve superare i $382^{\circ}C$ per evitare perdite di azoto.

Dopo raffreddamento e diluizione con acqua distillata esente da ammoniaca, il campione acido viene portato ad un pH alcalino per aggiunta di idrossido di sodio, quindi si distilla raccogliendo il distillato tal quale per la determinazione dell'ammoniaca con il reattivo di Nessler, oppure raccogliendo il distillato in una soluzione di acido borico per il dosaggio titrimetrico. In questo ultimo caso, il borato di ammonio viene titolato con una soluzione di riferimento di acido solforico in presenza di un indicatore misto.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile nell'intervallo 1-100 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Il nitrato, in concentrazioni superiori a 10 mg/L, interferisce negativamente in quanto può ossidare ad N_2O una parte dell'ammoniaca prodotta nel processo di digestione.

Interferenze positive sono causate dalla presenza di elevate concentrazioni di composti organici riducenti, che possono ridurre il nitrato ad ammoniaca.

In presenza di elevate quantità di sostanze organiche non azotate, che consumano acido solforico per la loro ossidazione a CO_2 ed H_2O , è necessario aggiungere altri 50 mL della soluzione acida (6.3) per ogni grammo di COD presente nel campione in esame, in modo tale da mantenere un rapporto ottimale tra acido e sali della miscela ossidante ed impedire un innalzamento della temperatura di digestione al di sopra di $380^{\circ}C$. In tal caso può risultare necessario aggiungere un volume maggiore della soluzione alcalina (6.5) per avere un pH nettamente basico ($pH > 11$), come richiesto dalla procedura di distillazione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

Poiché l'azoto organico nei campioni di acqua di scarico non sterili viene trasformato in ammoniaca, è necessario eseguire il dosaggio su campioni prelevati di fresco. Se l'analisi non può essere effettuata entro le 24 ore dal prelievo, il campione deve essere filtrato su filtro da 0,45 μm e conservato a 4°C, previa aggiunta di 1 mL di acido solforico concentrato su 1 L di campione.

5. Apparecchiature

5.1 *Apparecchio di digestione* comprendente un pallone di Kjeldahl a collo lungo di vetro Pyrex della capacità di 500/1000 mL.

5.2 *Apparecchio di distillazione* per la determinazione dell'azoto ammoniacale.

5.3 *Spettrofotometro*, dotato di celle con cammino ottico da 1 cm.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere di grado analitico. L'acqua utilizzata nella preparazione dei reattivi deve essere deionizzata ad elevato grado di purezza.

6.1 *Soluzione tampone di borato*

Sciogliere 9,5 g di $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ in 500 mL di acqua, aggiungere 88 mL di NaOH 0,1 N e diluire a 1 L.

6.2 *Acido solforico concentrato H_2SO_4 ($d=1,84$)*

6.3 *Soluzione di acido solforico-solfato di rame-solfato di potassio*

Sciogliere 134 g di K_2SO_4 e 7,3 g di CuSO_4 in circa 800 mL di acqua, aggiungere cautamente 134 mL di acido solforico concentrato. Raffreddare la soluzione e diluirla a 1 litro. La soluzione va mantenuta a 20°C per impedirne la cristallizzazione.

6.4 *Soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 6 M*

6.5 *Soluzione di idrossido di sodio-tiosolfato di sodio*

Sciogliere 500 g di idrossido di sodio (NaOH) e 25 g di tiosolfato di sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in acqua e diluire a 1 litro.

6.6 *Indicatore misto*

Mescolare 2 volumi di una soluzione allo 0,2% di rosso di metile in alcool etilico al 95% con 1 volume di soluzione allo 0,2% di blu di metilene in alcool etilico al 95%. La soluzione, conservata a 4°C, è stabile per circa 1 mese.

6.7 *Soluzione di acido borico con indicatore*

Sciogliere 20 g di acido borico (H_3BO_3) in acqua, aggiungere 10 mL di soluzione di indicatore misto e diluire a 1 L con acqua. Questa soluzione è stabile per circa un mese, se conservata a 4°C.

6.8 Soluzione di riferimento di acido solforico (H_2SO_4) 0,02 N

6.9 Reattivo di Nessler

7. Procedimento

Introdurre nel pallone Kjeldahl un volume noto del campione di acqua da esaminare. Il quantitativo di campione da impiegare può essere dedotto dalla seguente Tab. 1.

Tabella 1: Relazione tra concentrazione N org e volume campione

Contenuto di N organico nell'acqua (mg/L)	Volume di campione (mL)
0-1	500
1-10	250
10-20	100
20-50	50
50-100	25

Diluire, se necessario, il campione a 300 mL e neutralizzare a pH=7. Se il campione contiene cloro residuo aggiungere un volume opportuno di soluzione di tiosolfato di sodio (3,5 g/L di $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$): 1 mL di questa soluzione rimuove 1 mg/L di cloro residuo in 500 mL di campione. Aggiungere 25 mL di soluzione tampone di borato (6.1) e NaOH 6 N (6.4) fino a pH=9,5. Distillare l'ammoniaca libera finchè il distillato non dia più reazione positiva con il reattivo di Nessler.

La soluzione rimasta dalla distillazione dell'ammoniaca viene utilizzata per la determinazione dell'azoto organico. Aggiungere 50 mL del reattivo (6.3). Se il campione in esame contiene elevate quantità di sostanze organiche non azotate, aggiungere altri 50 mL di reattivo (6.3) per ogni grammo di COD contenuto nel campione.

Effettuare la digestione, facendo bollire la soluzione fino a che non diventa chiara e poi per altri 20-30 minuti. Lasciar raffreddare la soluzione ed aggiungere 300 mL di acqua distillata esente da ammoniaca. Connettere il pallone Kjeldahl all'apparecchio di distillazione immediatamente prima dell'aggiunta di 50 mL del reattivo (6.5); in tal modo si evitano perdite di ammoniaca, rilasciata a seguito del riscaldamento della soluzione conseguente al mescolamento. Il pH della soluzione dovrebbe essere maggiore di 11.

Distillare fin quando il distillato non dia più reazione con il reattivo di Nessler. Poiché i reattivi utilizzati possono contenere tracce di ammoniaca, sottoporre un bianco (acqua deionizzata) all'intera procedura analitica.

L'ammoniaca distillata può essere determinata:

- con il metodo di Nessler, previa preparazione di una curva di taratura (vedi Sezione 4030 "Azoto ammoniacale" Metodo A2);
- per titolazione mediante una soluzione di riferimento di H_2SO_4 0,02 N, impiegando l'indicatore rossometile-blu di metilene.

Nel caso in cui si utilizzi il metodo per titolazione, raccogliere il distillato in 50 mL di soluzione di acido bórico contenente l'indicatore misto (6.7). Durante l'operazione di distillazione, l'estremità inferiore del refrigerante deve essere costantemente immersa nella soluzione di acido bórico e la temperatura del refrigerante non deve superare i 29°C.

8. Calcoli

Il contenuto di azoto organico si ottiene dalla formula:

$$C = \frac{(a-b)}{V} N \cdot 14 \cdot 1000$$

dove:

C = concentrazione (mg/L) di N organico;

a = volume (mL) di H_2SO_4 0,02 N impiegato per il campione;

b = volume (mL) di H_2SO_4 0,02 N impiegato per il bianco;

V = volume (mL) di campione di acqua utilizzato;

N = normalità dell' H_2SO_4 titolante;

14 = peso equivalente dell'azoto.

9. Qualità del dato

Determinazioni eseguite (n=5) alla concentrazione di 3 mg/L di azoto hanno fornito un coefficiente di variazione, $[CV (\%) = (\text{scarto tipo}/\text{valore medio}) \cdot 100]$, pari all'1%. I valori di recupero sono risultati pari al 98% nell'intervallo 1-5 mg/L e del 99% nell'intervallo 5-50 mg/L. Per valutare l'accuratezza della procedura di digestione è consigliabile effettuare prove di recupero utilizzando soluzioni a concentrazione nota di acido nicotinico (verifica della completezza della procedura di digestione) e di cloruro di ammonio (verifica di eventuali perdite di azoto).

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): *"Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater"*, XX Ed. (Washington, APHA).

5040. Carbonio organico disciolto

Introduzione

Il carbonio può essere presente nelle acque sotto forma di specie inorganiche (carbonati, bicarbonati e anidride carbonica) e di composti organici che si distribuiscono tra fase disciolta e sospesa (Tab. 1). Il carbonio complessivo risultante dalla somma del carbonio inorganico (TIC) e di quello organico (TOC) presente nelle due fasi costituisce il carbonio totale (TC). Il carbonio organico disciolto (DOC) rappresenta la frazione organica di carbonio che passa attraverso una membrana filtrante da $\sim 1 \mu\text{m}$, mentre il carbonio organico sospeso o particolato (POC) rappresenta la frazione trattenuta dalla membrana. La somma di queste due frazioni dà il carbonio organico totale (TOC).

La determinazione della sostanza organica nelle acque è stata spesso effettuata, in attività di monitoraggio di corpi idrici e di controllo di qualità degli effluenti, facendo ricorso a parametri di tipo aspecifico quali la richiesta chimica di ossigeno (COD) e la richiesta biologica di ossigeno (BOD). La diffusione di questo

Tabella 1: Acronimi utilizzati per indicare le diverse specie di carbonio presenti nelle acque

Carbonio inorganico totale	TIC
Carbonio organico totale	TOC = DOC + POC
Carbonio totale	TC = TIC + TOC
Carbonio inorganico disciolto	DIC
Carbonio organico disciolto	DOC
Carbonio totale disciolto	DC = DIC + DOC
Carbonio organico particolato	POC

tipo di misure, che fa riferimento all'effetto prodotto dal carico organico sul bilancio di ossigeno del sistema, è stata favorita dalla semplicità e dal basso costo delle apparecchiature richieste. Tuttavia, la necessità di avere in tempi rapidi risposte sul contenuto di sostanza organica, l'opportunità di ridurre la produzione di rifiuti tossici derivanti dall'attività analitica (Hg, Ag e Cr(VI) nel caso del COD; sodioazide per il BOD) e l'interesse scientifico ad avere informa-

zioni puntuali sul carbonio organico hanno determinato un crescente interesse per determinazioni di tipo strumentale rivolte direttamente alla misura del carbonio.

La determinazione del carbonio come indice di sostanza organica è, tra l'altro, indipendente dallo stato di ossidazione di quest'ultima ed inoltre non comprende specie inorganiche che invece possono contribuire alla richiesta di ossigeno espressa dal BOD e dal COD. Il TOC, o meglio il DOC e il POC assumono notevole importanza nelle acque di mare, in quanto rappresentano l'unica via praticabile per determinare il contenuto di carbonio organico in matrici saline. Il BOD e il COD, infatti, a causa dell'interferenza dei cloruri (presenti in elevate concentrazioni) e dei bassi contenuti di sostanza organica, non possono essere utilizzati in acqua di mare.

Il problema chiave da affrontare per una corretta determinazione del carbonio organico è quello del bianco. In analisi strumentali di questo tipo il bianco risulta da due diversi contributi, quello dell'acqua ultrapura utilizzata per la taratura dello strumento e quello strumentale connesso con il tipo di apparecchiatura e, in particolare, di catalizzatore impiegato. Solo il secondo contributo è effettivamente da sottrarre alle misure sperimentali, ma in pratica è molto difficile distinguere i due contributi, per cui si finisce con il sottrarre il bianco complessivo; è ovvio quindi, che le misure potranno essere accurate solo nel caso in cui il bianco dell'acqua sia trascurabile rispetto a quello strumentale.

La delicatezza nell'esecuzione delle misure del bianco si manifesta soprattutto qualora si operi in acque marine ove i livelli di DOC sono in genere nell'intervallo $100\text{-}200 \mu\text{M}$. In altre matrici ove le concentrazioni di carbonio organico sono maggiori le incertezze sul bianco influenzano in misura minore l'accuratezza delle misure.

Il TOC è inserito tra i parametri indicatori nel D.Lgs. 31/2001 concernente le caratteristiche di qualità delle acque destinate al consumo umano, in quanto le sostanze organiche contenute in un'acqua possono reagire con i reattivi utilizzati nei processi di disinfezione e dar luogo a composti potenzialmente tossici o cancerogeni.

In un'acqua potabile i valori tipici di carbonio organico sono in genere inferiori a 1 mg/L mentre nelle acque di scarico si riscontrano livelli molto elevati di composti organici (>100 mg/L).

1. Principio del metodo

Il carbonio organico viene determinato mediante ossidazione catalitica ad alta temperatura (HTO) di una idonea quantità di campione. Il catalizzatore impiegato è costituito da platino supportato su una matrice inorganica (es. allumina, quarzo). Il campione di acqua viene, se necessario, diluito e ben omogeneizzato, quindi iniettato manualmente o mediante autocampionatore in corrente di ossigeno o di aria purificata nel tubo di combustione dove l'acqua viene vaporizzata e il carbonio organico ossidato a CO_2 e H_2O . La CO_2 gassosa viene determinata all'uscita del tubo mediante un rivelatore all'infrarosso.

Il metodo consente di impiegare un microcampione di acqua (50-200 μL) e di eseguire il dosaggio con rapidità e possibilità di automazione.

Dalla misura dell'area del picco di assorbimento IR della CO_2 prodotta, corretta del contributo del bianco, si ricava la concentrazione del carbonio organico o totale (vedi Capitolo 3 per interferenze da CO_2 inorganica) mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazione nota comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo è in grado di determinare le concentrazioni comunemente riscontrate in diverse matrici acquose (acque di scarico, superficiali e di mare). L'intervallo di concentrazioni misurabile è variabile in funzione delle condizioni sperimentali (tipo di apparecchiatura impiegata, aliquota di campione dosata).

3. Interferenze e cause di errore

Le operazioni di omogeneizzazione del campione, soprattutto in presenza di un innalzamento della temperatura, possono determinare una perdita di sostanze organiche volatili. L'eliminazione del carbonio inorganico mediante acidificazione e allontanamento della CO_2 con un gas inerte può provocare un'ulteriore perdita di sostanze organiche volatili. In questo caso la misura del carbonio organico si riferisce alla sola frazione non volatile ("not purgeable organic carbon", NPOC). Si può comunque notare che in molte acque superficiali e sotterranee la frazione volatile fornisce un contributo trascurabile al carbonio organico totale. Nel caso in cui si voglia tenere conto anche della frazione volatile si procede alla misura separata del carbonio totale e del carbonio inorganico, ricavando, poi, per differenza il carbonio organico totale (DOC). Il carbonio totale viene determinato iniettando il campione nel tubo di ossidazione senza procedere alla preventiva acidificazione del campione e all'allontanamento della CO_2 prodotta, mentre il solo carbonio inorganico viene dosato (quando lo strumento lo consenta) introducendo il campione in un recipiente di reazione dove viene fatto reagire con un acido (HCl) a temperatura ambiente. In questo modo, solo i carbonati e bicarbonati convertiti in CO_2 e la CO_2 disciolta raggiungono il rivelatore.

Si desidera sottolineare la delicatezza dell'interferenza da CO_2 inorganica. Nelle acque naturali, infatti, il carbonio inorganico è superiore di un fattore 20 circa rispetto all'organico, per cui anche piccole tracce residuali di inorganico dell'ordine dell'1% comporteranno un errore significativo nella determinazione del carbonio organico.

La filtrazione del campione, operazione necessaria per eliminare il materiale sospeso, può

comportare un aumento o una diminuzione del DOC, in funzione delle proprietà fisiche dei composti del carbonio e dell'eventuale adsorbimento o desorbimento di materiale carbonioso. È opportuno valutare il contributo al DOC dovuto al filtro analizzando un bianco di filtrazione.

Eventuali contaminazioni derivanti dai reattivi, dalla vetreria, dai materiali plastici utilizzati possono essere verificate mediante l'effettuazione di bianchi procedurali.

4. Campionamento e conservazione del campione

Conservare i campioni di acqua in bottiglie di vetro scuro, dotate di tappi con guarnizioni in teflon o in contenitori di polietilene ad alta densità. Nel primo caso le bottiglie vanno lavate con acido diluito (HCl 1 M) e trattate in muffola a 550°C per 3-4 ore. Per i tappi è sufficiente un lavaggio accurato in acqua. Nel secondo caso è consigliabile una procedura di decontaminazione mediante trattamento con HNO₃ 1,5 M in stufa a 50°C per un'ora, seguito da risciacqui abbondanti con acqua ultrapura. Contenitori di altro materiale plastico possono essere utilizzati dopo aver attentamente verificato che non rilascino sostanze contenenti carbonio.

Procedure di pulizia meno rigorose sono consentite se le concentrazioni di carbonio organico da determinare sono relativamente alte.

Per la determinazione del carbonio organico disciolto (DOC) i campioni di acqua vengono filtrati immediatamente dopo il prelievo su filtri in fibra di vetro precombusti in muffola a 480°C per quattro ore. Per la filtrazione di piccoli volumi (fino a 100 mL) si possono utilizzare filtri montati su un sistema filtrante costituito da una siringa in PVC con portafiltri in policarbonato, un dispositivo che limita le possibilità di contaminazione del campione. Per la filtrazione di volumi più elevati (1-2 litri) si può ricorrere ad un sistema filtrante in vetro borosilicato, preliminarmente trattato in muffola, collegato ad una pompa da vuoto per facilitare la filtrazione. Tra il prelievo del campione e l'analisi deve intercorrere il minor tempo possibile. I campioni debbono essere conservati a bassa temperatura, al riparo della luce e dell'aria, onde prevenire fenomeni di decomposizione batterica e di ossidazione così come fenomeni di produzione di sostanze organiche da attività fitoplanctonica. Nel caso in cui non sia possibile analizzare immediatamente il campione si consiglia di congelarlo a -20°C.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura da laboratorio

Tutta la vetreria e i contenitori di materiale plastico dovranno essere preventivamente trattati secondo le modalità indicate al Capitolo 4.

5.2 Miscelatore a sbattimento o omogeneizzatore

5.3 Agitatore magnetico dotato di ancorette in teflon.

5.4 Microsiringhe per iniettare volumi fino a 1000 µL.

5.5 Analizzatore di carbonio organico totale

Utilizza la tecnica della combustione ed è dotato di un sistema di rivelazione all'infrarosso non dispersivo (Fig. 1). In alternativa, esistono in commercio strumenti dotati di rivelatori a ionizzazione di fiamma in grado di determinare il metano prodotto dalla reazione di conversione della CO₂.

5.6 pHmetro, completo di elettrodo indicatore e di riferimento.

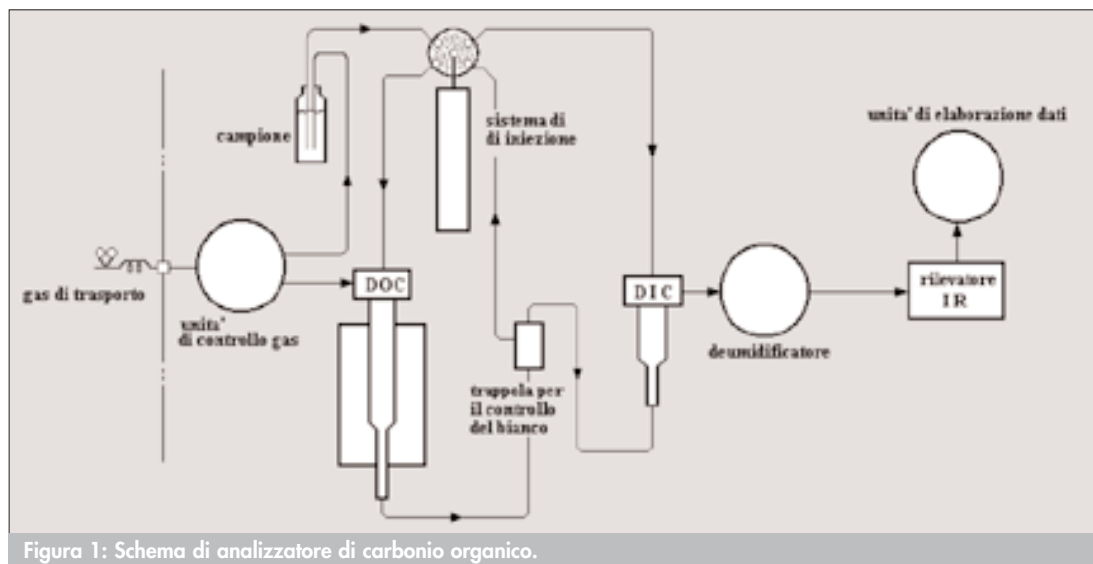


Figura 1: Schema di analizzatore di carbonio organico.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere di grado ultrapuro per analisi in tracce.

6.1 Acqua ultrapura

Utilizzare l'acqua, esente da CO_2 , per la preparazione dei bianchi, delle soluzioni di riferimento e per il risciacquo finale della vetreria, avendo cura di evitare al massimo il contatto con l'aria.

6.2 Acido cloridrico concentrato HCl ($d=1,19$)

6.3 Soluzione di riferimento concentrata contenente 1000 mg/L di carbonio organico

Sciogliere 0,2125 g di ftalato acido di potassio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$) in acqua (6.1) e portare a volume in matraccio tarato da 100 mL. Acidificare con HCl (6.2) fino a $\text{pH}=2$ e conservare in recipiente ben chiuso, al buio e a 4°C . La soluzione è stabile per circa due mesi.

6.4 Soluzione di riferimento concentrata contenente 1000 mg/L di carbonio inorganico

Sciogliere 0,3497 g di idrogeno carbonato di sodio, NaHCO_3 , e 0,4418 g di carbonato di sodio anidro, Na_2CO_3 , in acqua (6.1) e portare a volume in matraccio tarato da 100 mL. Conservare la soluzione in un recipiente ben chiuso.

6.5 Materiale per il riempimento dei tubi per lo sviluppo di CO_2

Il materiale e le modalità di riempimento devono essere quelli consigliati dalla ditta costruttrice dell'apparecchio analizzatore (5.5).

6.6 Aria ultrapura, esente da CO_2 e idrocarburi.

Il controllo della linea di base strumentale consente di verificare la purezza dell'aria.

7. Procedimento

Le differenze tra le varie apparecchiature (5.5) disponibili non consentono una codificazione dettagliata di istruzioni adatte ad ogni tipo di strumento. Quindi, per l'attivazione e la predisposizione dell'apparecchio al funzionamento attenersi alle indicazioni riportate nel manuale dello strumento che indica, di norma, anche le condizioni più appropriate per l'esecuzione delle analisi.

Il volume di campione da iniettare nel tubo di combustione è variabile a seconda della capacità del tubo stesso e della quantità di carbonio da dosare.

Il campione viene iniettato quando l'apparecchio è già stato portato a regime per quello che riguarda il flusso di aria, la temperatura dei tubi di combustione, la parte elettronica, ecc.

7.1 Taratura

Costruire la curva di taratura all'inizio di ogni ciclo analitico utilizzando soluzioni di riferimento in numero sufficiente a garantire una corretta interpolazione delle concentrazioni misurate. Le concentrazioni delle soluzioni di riferimento saranno scelte all'interno del campo di linearità dello strumento, nell'intervallo di valori atteso per i campioni.

Verificare ad intervalli regolari la validità della curva di taratura inserendo, in una serie di campioni, l'analisi di un bianco e di una soluzione di riferimento.

7.1.1 Carbonio totale e organico

Per la preparazione delle soluzioni di riferimento per la taratura, diluire opportunamente con acqua (6.1) la soluzione di riferimento concentrata (6.3). Iniettare a turno un'aliquota delle soluzioni preparate nel tubo di combustione e registrare l'area del picco di assorbimento IR della CO₂ prodotta. Effettuare almeno tre repliche per ogni soluzione da analizzare. Costruire la curva di taratura riportando in ascissa le concentrazioni di carbonio organico in mg/L e in ordinata le aree dei picchi corrette del valore ottenuto da un bianco di acqua (6.1) sottoposto alla stessa procedura delle soluzioni di riferimento.

La curva di taratura può essere ottenuta direttamente se si dispone di un sistema di elaborazione dati collegato all'apparecchio analizzatore.

7.1.2 Carbonio inorganico

Per la preparazione delle soluzioni di riferimento per la taratura, diluire opportunamente con acqua (6.1) la soluzione di riferimento concentrata (6.4). Iniettare a turno un'aliquota delle soluzioni preparate nel recipiente di reazione per il carbonio inorganico nel caso di uso di strumenti che prevedono questa possibilità; la CO₂ prodotta viene trasferita dal gas di trasporto al rivelatore IR ed ivi misurata. Effettuare, anche in questo caso, almeno tre repliche per ogni soluzione da analizzare. Per la costruzione della curva di taratura procedere come descritto nel Sottoparagrafo 7.1.1.

7.2 Dosaggio del campione

Se il campione contiene sostanze oleose in superficie e/o sostanze colloidali, dibattere per 10 minuti nell'apposito miscelatore (5.1) circa 250 mL di campione in modo da favorirne la dispersione. Per campioni che presentano tenori elevati di acidi, basi e sali è opportuno procedere ad una preventiva diluizione del campione per migliorare la precisione delle misure ed evitare un rapido deterioramento del catalizzatore e la corrosione di parti strumentali.

Iniettare il campione nel tubo di combustione adottando le stesse condizioni operative utilizzate per la curva di taratura. Ripetere le iniezioni più volte fino ad avere una ripetibilità su tre letture consecutive entro il $\pm 2\%$.

Per ricavare dal carbonio totale la concentrazione del carbonio organico (DOC), il carbonio inorganico deve essere determinato separatamente o allontanato mediante acidificazione del campione sotto flusso di gas inerte. La misura del carbonio inorganico, quando lo strumento

lo consenta, viene effettuata seguendo le modalità indicate al Sottoparagrafo 7.1.2 per la costruzione della relativa curva di taratura. La determinazione del carbonio organico può essere effettuata soltanto nel caso in cui le frazioni organica ed inorganica siano confrontabili. Nel caso di differenze marcate (ad esempio qualora la frazione organica sia molto piccola), c'è il rischio che le incertezze associate alle misure del carbonio totale e della frazione inorganica producano errori elevati sulla stima per differenza.

Se, invece, si ricorre all'eliminazione del carbonio inorganico prima dell'analisi, trasferire un'aliquota di campione rappresentativa (20-50 mL) in un recipiente e aggiungere acido cloridrico concentrato (6.2) per avere un pH inferiore a 2. In queste condizioni, i carbonati e i bicarbonati vengono trasformati in CO₂ che viene allontanato dalla soluzione facendo gorgogliare un gas, aria purissima (6.6) o altro gas esente da CO₂ e idrocarburi, per 10 minuti. Iniettare quindi il campione nel tubo di combustione seguendo le modalità indicate per il carbonio totale. In questo caso, la frazione volatile del carbonio organico viene eliminata insieme al carbonio inorganico e si ottiene il NPOC ("not purgeable organic carbon"), per distinguerlo dal DOC indicato in precedenza.

8. Calcoli

8.1 Carbonio totale disciolto

Il valore medio dell'area del picco, corretto del valore del solo bianco strumentale o del bianco complessivo (bianco dell'acqua + bianco strumentale) qualora non sia possibile distinguere tra i due contributi e comunque nel caso in cui il valore complessivo sia inferiore a 15-20 μM e quindi possa essere attribuito in gran parte al bianco strumentale, consente di ricavare dalla curva di taratura (7.1.1) la concentrazione di carbonio totale disciolto (DC) nel campione in esame, espressa in mg/L.

8.2 Carbonio inorganico disciolto

Dal valore medio dell'area del picco, corretto del valore del bianco strumentale (in questo caso la procedura di acidificazione e insufflazione con azoto o aria ultrapura consente di avere un'acqua esente da CO₂), ricavare mediante la curva di taratura (7.1.2) la concentrazione di carbonio inorganico disciolto (DIC) nel campione in esame, espressa in mg/L.

8.3 Carbonio organico disciolto

Il carbonio organico disciolto si ottiene dalla differenza:

$$\text{DOC} = \text{DC} - \text{DIC}$$

dove:

DOC = concentrazione (mg/L) di carbonio organico disciolto;

DC = concentrazione (mg/L) di carbonio totale disciolto;

DIC = concentrazione (mg/L) di carbonio inorganico disciolto.

Se il carbonio inorganico viene rimosso prima dell'analisi del campione, ricavare dalla curva di taratura 7.1.1 la concentrazione di mg/L di NPOC, espressa in mg/L.

9. Qualità del dato

Con gli analizzatori di carbonio attualmente disponibili è possibile ottenere una precisione, espressa come coefficiente di variazione, dell'1-2%. Misure di DOC effettuate da 59 laboratori su due campioni di acqua di mare, uno tal quale, l'altro addizionato con glucosio ad una concentrazione di 50 μmoli/L di C, hanno fornito un'accuratezza del ±10%.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard methods for the examination of water and wastewater", XX Ed., (Washington, APHA).

BENNER R. & STROM M. (1993): "A critical evaluation of the analytical blank associated with DOC measurements by high-temperature catalytic oxidation", *Mar. Chem.*, **41**, 153-160.

CAUWET G. (1994): "HTCO method for dissolved organic carbon analysis in seawater: influence of catalyst on blank estimation", *Mar. Chem.*, **47**, 55-64.

DONAHUE W.F., SCHINDLER D.W., PAGE S.J. & STANTON M.P. (1998): "Acid-induced changes in DOC quality in an experimental whole lake manipulation", *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 2954-2960.

MILLER W.L. & MORAN M.A. (1997): "Interaction of photochemical and microbial process in the degradation of refractory dissolved organic matter from a coastal marine environment", *Limnol. Oceanogr.*, **42** (6), 1317-1324.

PELTZER E.T. & BREWER P.G. (1993): "Some practical aspects of measuring DOC: sampling artifacts and analytical problems with marine samples", *Mar. Chem.*, **41**, 243-252.

SHARP J.H., BENNER R., BENNETT L., CARLSON C.A., FITZWATER S.E., PELTZER E.T. & TUPAS L. M. (1995): "Analyses of dissolved organic carbon in seawater: the JGOFS EqPac methods comparison", *Mar. Chem.*, **48**, 91-108.

STRICKLAND J.D.H. & PARSONS T.R. (1968): "A practical handbook of seawater analysis", Fisheries Research Board of Canada, **167**, 153.

TUPAS L.M., POPP B.N. & DAVID M.K. (1994): "Dissolved organic carbon in oligotrophic waters: experiments on sample preservation, storage and analysis", *Mar. Chem.*, **45**, 207-216.

WETZEL R.G. & LIKENS G.E. (1991): "Limnological analyses", Springer.

5050. Diserbanti ureici

Introduzione

I diserbanti fenilureici, tra cui il più utilizzato in Italia è il Linuron, sono erbicidi selettivi, impiegati in pre- e post-emergenza per il controllo di un'ampia varietà di colture quali quelle orticole (patate, carote, pomodori, ecc.), floreali, intensive (mais, frumento, orzo, soia, girasole) e frutteti.

Il loro meccanismo d'azione si esplica attraverso l'inibizione della fotosintesi mediante assorbimento radicale o per contatto sulle superfici fogliari delle infestanti. Nell'ambiente, questi composti sono rapidamente degradati per fotolisi, come descritto in diversi studi già da tempo effettuati, particolarmente in soluzione acquosa. Anche i microorganismi giocano un ruolo importante nella degradazione delle feniluree. La loro azione, che è molto complessa, si esplica attraverso diversi possibili meccanismi, che dipendono da numerosi fattori, quali la temperatura, il pH del terreno, la presenza di nutrienti o di sostanze tossiche, le caratteristiche di adsorbimento e deadsorbimento da parte delle particelle del terreno.

Accanto alle feniluree, sono state recentemente immesse sul mercato le solfoniluree, caratterizzate da bassi quantitativi d'uso ed alta fitotossicità. A causa della loro alta selettività verso le infestanti e la loro bassa tossicità verso i mammiferi, questi diserbanti sono diventati i nuovi sostituti di alcuni vecchi composti come le triazine e i clorofenossicarbossilici.

Le solfoniluree sono usate in pre- e post-emergenza, per il controllo dei cereali, in particolare del riso, delle patate e della barbabietola da zucchero. La loro attività erbicida è dovuta alla rapida inibizione di un enzima, Acetolattato Sintetasi (ALS), necessario per la sintesi di aminoacidi essenziali per la crescita delle piante.

Poiché questi composti sono termicamente instabili, la loro determinazione per via gascromatografica è generalmente preceduta da derivatizzazione o idrolisi. Al contrario, la cromatografia liquida permette di determinare direttamente la loro presenza, dopo aver effettuato una efficace preconcentrazione del campione, per poter raggiungere bassi livelli di rilevabilità.

1. Principio del metodo

I diserbanti fenil e solfonilureici vengono estratti dalla matrice acquosa mediante estrazione liquido/liquido o estrazione in fase solida (SPE) ed analizzati in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con rivelatore UV, possibilmente con Diode Array (UV-DAD). I costituenti sono separati in gradiente di eluizione e quantificati per confronto tra le aree dei rispettivi picchi cromatografici e quelle delle relative soluzioni di riferimento, sulla base di opportune rette di taratura. Per una migliore accuratezza del metodo, si può utilizzare come riferimento interno, aggiunto nel campione acquoso, immediatamente prima dell'estrazione, il Monolinuron (erbicida non in vendita in Italia). I risultati sono espressi in $\mu\text{g/L}$ per ciascun principio attivo.

2. Campo di applicazione

Il metodo viene applicato alle acque naturali (superficiali, sotterranee) e di scarico, nell'intervallo di concentrazione compreso tra $0,1 \mu\text{g/L}$ e $50 \mu\text{g/L}$. La quantità iniziale di campione da estrarre può variare da 100 mL a 2000 mL, in relazione alla complessità della matrice da

Tabella 1: Principi attivi

	Composto
1	Diuron
2	Isoproturon
3	Metobromuron
4	Linuron
5	Tifensulfuron metile
6	Metasulfuron metile
7	Cinosulfuron
8	Clorsulfuron
9	Rimsulfuron
10	Bensulfuron metile

esaminare ed alla concentrazione degli analiti. I principi attivi ricercati, appartenenti a queste categorie, sono riportati in Tab. 1.

3. Interferenze e cause di errore

Composti organici con tempi di ritenzione simili o identici a quelli degli analiti di interesse possono interferire con la determinazione. Per i picchi con tempo di ritenzione uguale al riferimento, è opportuno verificarne la presenza variando le condizioni cromatografiche ed usando una colonna di diversa polarità. Il sistema UV-DAD, che permette di richiamare lo spettro di assorbimento dei composti rilevati, consente di stabilire se il picco con lo stesso tempo di ritenzione del riferimento corrisponde effettivamente al composto ricercato. Nel caso di sovrapposizioni parziali di picchi, si dovranno considerare accettabili, per la quantificazione, quelli con una risoluzione superiore al 70% oppure utilizzare un "software" dedicato per la lettura della deconvoluzione dei segnali parzialmente sovrapposti.

La presenza di picchi interferenti, dovuti alla contaminazione dell'ambiente di lavoro, può essere mantenuta sotto controllo mediante l'effettuazione di uno o più bianchi, ottenuti sottoponendo ad analisi completa campioni di acqua distillata esente da sostanze organiche.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo dei campioni dovrà essere effettuato in bottiglie di vetro scuro, con chiusura a smeriglio oppure a vite con guarnizione di teflon. La concentrazione di diserbanti presenti può essere diminuita dall'attività biologica del campione, pertanto si dovrà procedere all'analisi nel minor tempo possibile dopo il prelievo (al massimo 48 ore), mantenendo i campioni fino al momento dell'analisi a 4°C e al riparo dalla luce.

Se non è possibile analizzare il campione in breve tempo è consigliabile effettuare almeno l'estrazione e conservare l'estratto a 4°C, oppure verificare la stabilità del campione aggiungendo un riferimento interno, ad esempio Monolinuron, o comunque un composto con comportamento chimico-fisico equivalente.

5. Apparecchiature

5.1 *Cromatografo liquido ad alta prestazione (HPLC) con rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile o a serie di diodi.* Si consiglia l'uso di una colonna di separazione a fase inversa con resina del tipo C₈, C₁₈, fenil, ciano. La colonna deve essere in grado di fornire un'adeguata efficienza e risoluzione nella separazione dei picchi degli analiti. La fase mobile, la composizione e la durata del gradiente ed il flusso di lavoro sono correlati al tipo e dimensioni della colonna utilizzata. Il sistema di acquisizione dei dati può essere costituito da personal computer o integratore.

5.2 *Adsorbenti per l'estrazione SPE, costituiti da silice legata a catene a 8 o 18 atomi di*

carbonio, resine stirene divinilbenzene, su supporti a disco o in cartucce, e cartucce di carbone grafitato. La procedura di condizionamento, estrazione ed eluizione viene effettuata sotto vuoto, secondo le modalità consigliate dal produttore, montando il supporto del materiale adsorbente su una beuta da vuoto o su un sistema multiplo per estrazione liquido-solido, disponibile in commercio.

5.3 *Normale vetreria da laboratorio di classe A.*

5.4 *Bilancia analitica, risoluzione 0,1 mg.*

5.5 *Evaporatore rotante*

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua deve essere esente da sostanze organiche.

6.1 *Acetone, etile acetato, metanolo, diclorometano puri per pesticidi.*

6.2 *Acetonitrile per HPLC*

6.3 *HCl, NaCl e Na₂SO₄*

6.4 *Filtri in fibra di vetro o polvere di vetro con particelle da 40 microns di diametro, da utilizzare per la filtrazione in linea delle acque contenenti solidi sospesi particellari o colloidali.*

6.5 *Acido acetico glaciale*

6.6 Soluzioni di riferimento (*Diserbanti ureici con purezza non inferiore al 95%, possibilmente certificati*).

6.6.1 Soluzioni concentrate di diserbanti ureici

Pesare 10 mg di ognuno dei principi attivi della Tabella 1 sopramenzionata, trasferirli in matracci tarati da 100 mL e portare a volume con acetonitrile. Queste soluzioni possono essere conservate a 4°C per tre mesi.

6.6.2 Soluzioni di riferimento

Preparare un minimo di tre soluzioni di riferimento contenenti gli analiti in miscela, aggiungendo accuratamente, in funzione della concentrazione degli analiti desiderata, volumi misurati delle singole soluzioni concentrate (6.6.1) in matracci tarati, portando poi a volume con acetonitrile.

È consigliabile costruire rette di taratura lineari non superiori ad un ordine di grandezza, ad esempio da 0,1 mg/L a 1 mg/L con almeno un punto intermedio (ad esempio 0,5 mg/L).

Le soluzioni di lavoro possono essere conservate a 4°C per circa un mese.

7. Procedimento

7.1 *Trattamento preliminare del campione*

Portare tutte le soluzioni di riferimento (6.6.2) ed i campioni a temperatura ambiente prima di iniziare ogni analisi.

Prima dell'estrazione, agitare il campione per ottenere una maggiore omogeneità. Se si utilizza il riferimento interno, aggiungere un volume idoneo di soluzione, in modo che la sua concentrazione finale, dopo la procedura di estrazione, sia la stessa usata nelle soluzioni di riferimento (6.6.2).

7.1.1 Estrazione liquido/liquido

Un litro di campione viene addizionato con 50 mL di una soluzione satura di sodio cloruro ed estratto in imbuto separatore, o con analogo dispositivo idoneo all'estrazione liquido/liquido, con 100 mL di etile acetato. La fase acquosa, successivamente portata a pH acido (circa 2) con acido cloridrico, è estratta con una seconda aliquota da 100 mL di etile acetato. Gli estratti riuniti, anidrificati con solfato di sodio anidro e portati a secchezza mediante evaporatore rotante in bagno termostatico a 35°C, seccati in corrente di azoto, sono ripresi con 1 mL di acetonitrile. L'estratto ottenuto è analizzato mediante HPLC-UV.

La Fig. 1 mostra una tipica separazione dei principi attivi in esame, con questa procedura.

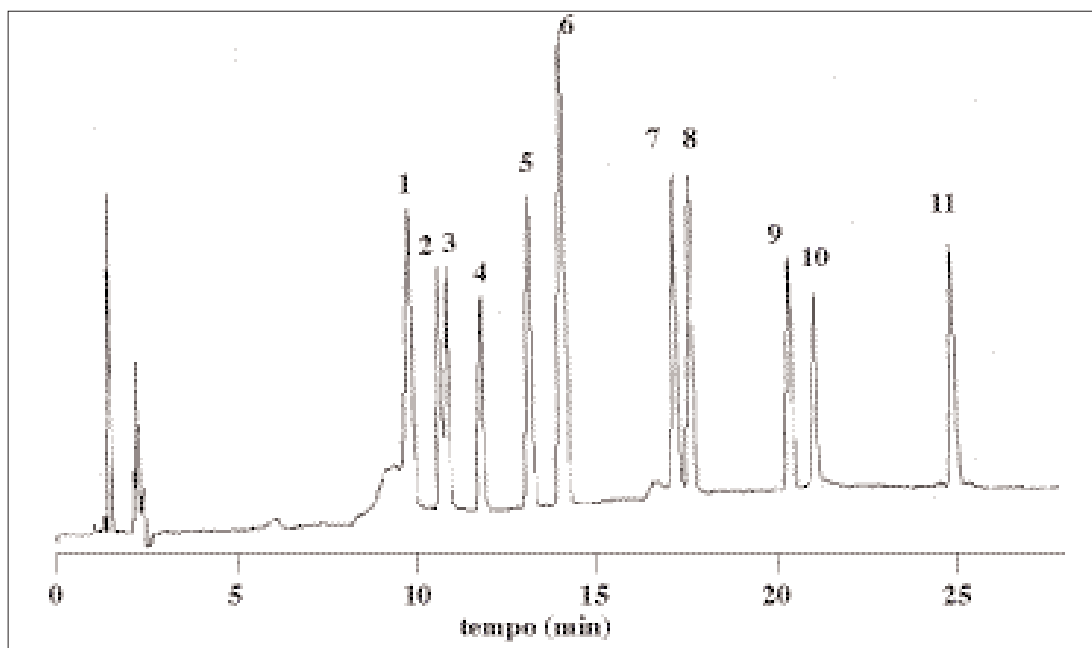


Figura 1: Cromatogramma, ottenuto a 240 nm, di un litro di acqua superficiale contaminato con 10 µg/L di ciascun principio attivo di Tab. 1, estratto con tecnica liquido/liquido. Condizioni analitiche: colonna cromatografica Hyper-sil ODS, 200x2,1 mm, dimensione particelle 5 µm, flusso 1,2 mL/min. Gradiente (acetonitrile + acido acetico 1%/acqua + acido acetico 1%): da 15:85 (inizio gradiente) a 65:35 in 50 min, volume iniettato 10 µL.

7.1.2 Estrazione in fase solida con resine stirene-divinilbenzene (SDVB)

Lavare e condizionare il substrato adsorbente con metanolo seguito da acqua ultrapura. Filtrare attraverso la fase solida, con un flusso non superiore a 3 mL/min, un volume noto di campione, variabile da 100 mL a 1000 mL in relazione alla complessità della matrice. Nel caso di campioni contenenti materiale in sospensione, è consigliabile utilizzare filtri in fibra di vetro o polvere di vetro in linea al substrato adsorbente, in modo tale da effettuare una preventiva filtrazione del particolato che potrebbe intasare il substrato stesso, e da consentirne l'estrazione all'atto del passaggio dell'eluente.

Far passare aria per 30 minuti attraverso l'adsorbente in modo da eliminare le tracce di acqua trattenuta ed eluire gli analiti mediante due aggiunte successive, con un intervallo di 5 minuti tra l'una e l'altra, di 2,5 mL di una soluzione acetonitrile/metanolo 1:1 (v/v).

Evaporare a piccolo volume l'eluato sotto debole corrente d'azoto a temperatura ambiente e portare a un volume finale di 1 mL con acqua distillata, esente da sostanze organiche.

Come riferimento interno (surrogato) può essere utilizzato Monolinuron (erbicida non in vendita in Italia) aggiunto al campione nel momento dell'arrivo in laboratorio, in modo da verificare la stabilità del campione stesso e l'efficacia dell'estrazione.

La Fig. 2 mostra una tipica separazione di diserbanti fenilureici con questa procedura.

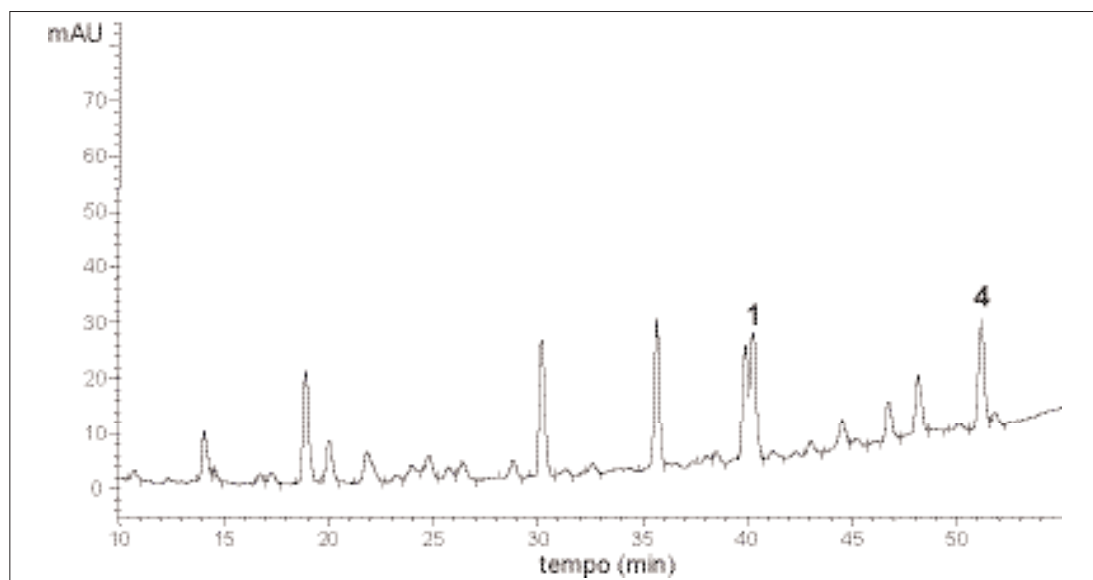


Figura 2: Cromatogramma, ottenuto a 250 nm, di un campione di acqua di falda superficiale contaminato con 1 µg/L di ciascun composto, estratto con cartuccia LiChrolut EN (Merck, Germania) da 200 mg. Condizioni analitiche: colonna cromatografica Lichrosphere 5100 C18 (HPLC Technology, Gran Bretagna) 250 x 4,6 mm, dimensione particelle 5 µm, flusso 0,7 mL/min. Gradiente (acqua/acetonitrile) da 40:60 (inizio gradiente) a 75:25 in 20 min, volume iniettato 25 µL. I picchi non contrassegnati dal numero si riferiscono a metaboliti ureici non inseriti nel gruppo degli analiti considerati nel presente metodo.

7.1.3 Estrazione SPE con cartuccia di carbone grafitato

Per l'estrazione in fase solida, possono essere utilizzate le cartucce SPE in carbone grafitato disponibili in commercio (0,5 g).

Condizionare la cartuccia SPE con 8 mL di fase eluente (diclorometano/metanolo 80:20 (v/v), acidificato con acido acetico 10 mmoli/L), 2 mL di metanolo e 20 mL di acqua distillata (acidificata a pH=2). Far passare il campione (500 mL o 50 mL, rispettivamente per acque superficiali o di scarico), attraverso la cartuccia SPE ad un flusso di 70-100 mL/min. Staccare la pompa e riempire la cartuccia con 20 mL di acqua distillata, che viene fatta passare attraverso il carbone ad un flusso di 5 mL/min. Portare a secco il substrato adsorbente sotto vuoto per un minuto. Far passare 0,5 mL di metanolo per gravità e portare a secco il substrato adsorbente sotto vuoto per un minuto. Invertire la cartuccia introducendo in essa un pistone cilindrico di teflon, avente base conica e una punta di tipo Luer, fino a venire a contatto con il setto superiore della cartuccia stessa. Eluire le solfoniluree con 8 mL di una miscela diclorometano/metanolo 80:20 (v/v), acidificata con acido acetico 10 mmoli/L, raccogliendo l'eluato in una provetta. Evaporare a secchezza a 40°C con un moderato flusso di azoto. Non lasciare la provetta per più di un minuto nel bagno termostatico dopo la totale evaporazione del solvente. Riprendere il residuo con 200 µL di una miscela acqua/acetonitrile (80:20 v/v) acidificata con acido acetico 2 mmoli/L ed analizzarlo mediante HPLC-UV.

La Fig. 3 mostra una tipica separazione di diserbanti solfonilureici con questa procedura.

7.2 Analisi

Dopo aver impostato le condizioni cromatografiche, attendere che il sistema sia stabilizzato, controllando la linearità della linea di base, quindi iniettare la miscela dei principi attivi esaminati a tre o più livelli di concentrazione, per la costruzione della retta di taratura.

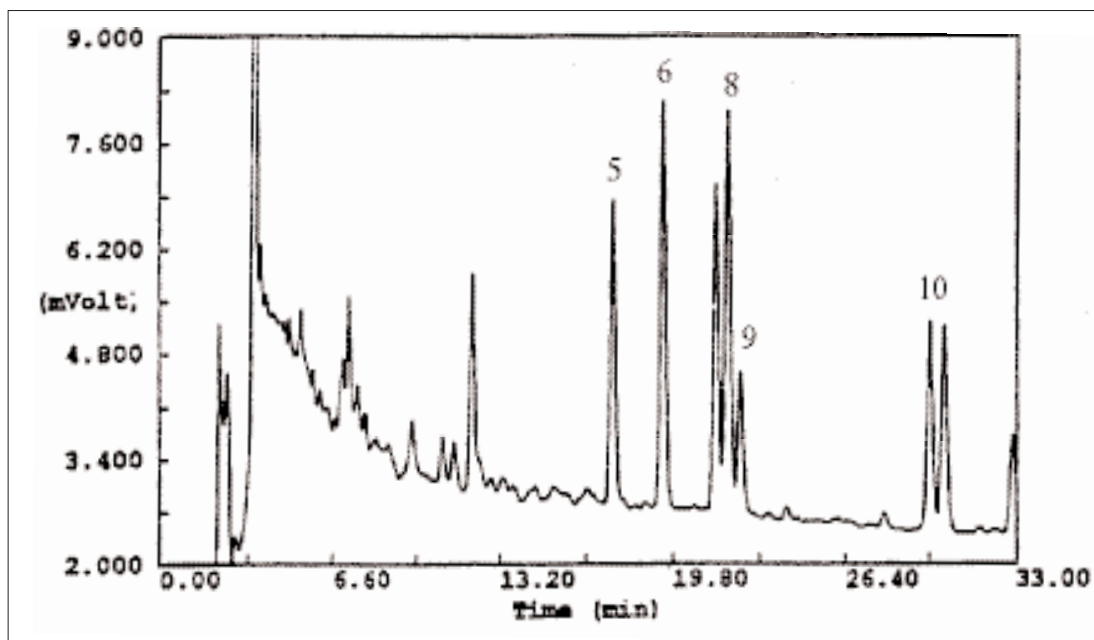


Figura 3: Cromatogramma, ottenuto a 230 nm, di 0,5 L di un campione di acqua superficiale contaminato con 2 µg/L di 5 solfoniluree tra quelle esaminate ed estratto con una cartuccia di carbone grafitato "Carbograph-4" da 500 mg. Condizioni analitiche: colonna cromatografica Alltech Alltima C18, 250 x 4,6 mm, dimensione particelle 5 µm, flusso 1 mL/min. Gradiente (acetonitrile + TFA 3 mmoli/L / acqua + TFA 3 mmoli/L): da 32:68 (inizio gradiente) a 62:38 in 40 min, volume iniettato 50 µL.

Verificare la presenza di eventuali interferenti dovuti al processo, mediante l'iniezione di un campione d'acqua esente da sostanze organiche estratto con le stesse modalità del campione ("bianco").

Iniettare i campioni ed effettuare l'eventuale riconoscimento qualitativo per confronto con i tempi di ritenzione delle soluzioni di riferimento. Nei casi di positività, qualora si operi con un sistema UV-DAD, è possibile richiamare lo spettro di assorbimento del picco cromatografico con lo stesso tempo di ritenzione del riferimento e verificarne la sovrapposibilità con lo spettro del riferimento stesso. In assenza di sistema DAD, ripetere l'analisi cromatografica con un'altra colonna di differente polarità.

Completata l'identificazione qualitativa dei picchi, procedere all'analisi quantitativa, introducendo nel cromatografo volumi uguali di campione e di soluzioni di riferimento. Preparare almeno 3 miscele di riferimento dei principi attivi (vedi Sottoparagrafo 6.6.2) ad opportune concentrazioni. Costruire quindi le rette di taratura per i singoli composti, accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento, riportando in grafico l'area del picco del componente (A) in funzione della concentrazione del componente stesso ed interpolando i punti sperimentali con il metodo dei minimi quadrati. Ricavare il coefficiente angolare (a) e l'intercetta (b) della retta di taratura.

8. Calcoli

La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

$$C = \frac{A - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:

C = concentrazione (µg/L) di diserbante;

A = area del picco del diserbante nella miscela incognita;

b = valore dell'intercetta della retta di taratura;

α = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
 V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
 V_i = volume (mL) del campione acquoso.

Nel caso in cui si utilizzi il riferimento interno, si riporta in grafico il rapporto area picco componente/area picco di riferimento interno (A/A_{si}) in funzione della concentrazione del componente stesso. La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

$$C = \frac{A/A_{si} - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:

C = concentrazione ($\mu\text{g/L}$) di diserbante;
 A = area del picco del diserbante nella miscela incognita;
 A_{si} = area del picco del riferimento interno nella miscela incognita;
 b = valore dell'intercetta della retta di taratura;
 α = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
 V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
 V_i = volume (mL) del campione acquoso.

Accertarsi che la concentrazione del campione sia all'interno dell'intervallo di concentrazione utilizzato per la curva di taratura.

9. Qualità del dato

La precisione del metodo è calcolata mediante misure di ripetibilità del dato, ottenute iniettando campioni di acqua superficiale incrementati a due diversi livelli di concentrazione ed estratti. Il procedimento è ripetuto su almeno cinque aliquote di campione a ciascuna concentrazione.

Le procedure sperimentali sopra riportate sono state verificate mediante una sperimentazione che ha consentito di stabilire che i recuperi dei vari composti fenilureici sono superiori all'80% con un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Per le solfoniluree, estratte con il metodo liquido/liquido, i recuperi sono superiori al 70% con un coefficiente di variazione inferiore al 12%.

L'accuratezza del metodo è ottenuta dal recupero medio percentuale delle prove effettuate sulle diverse aliquote dei due campioni incrementati.

Per verificare l'efficacia dell'estrazione, è conveniente effettuare, contemporaneamente ai campioni, l'analisi di un "bianco" incrementato con la miscela dei composti di interesse, alla concentrazione più vicina possibile a quella presunta dei campioni stessi.

Il limite di rivelabilità del metodo calcolato per acque naturali è di 0,1 $\mu\text{g/L}$, mentre per le acque di scarico è di 1 $\mu\text{g/L}$.

Nota: si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".

Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

- BORGAARD O.K. & STREIBIG J.C. (1989): "Chlorsulfuron adsorption by selected soil samples", *Acta Agriculturae Scandinavica*, **39**, 351-360.
- BROWN H. (1990): "Mode of action, crops selectivity and soil relations of the sulfonylurea herbicides", *Pesticide Science*, **29**, 263-281.
- CORBETT J.R., WRIGHT K. & BAILLE A.C., (1984): "*The Biochemical Mode of Action of Pesticides*", Academic Press, New York, 2nd ed., 56.
- DI CORCIA A., CRESCENZI C., SAMPERI R. & SCAPPATICCIO L. (1997): "Trace analysis of sulfonylurea herbicides in water: extraction and purification by a Carbograph 4 cartridge, followed by liquid chromatography with UV detection, and confirmatory analysis by an Electro-spray/Mass Detector", *Anal. Chem.*, **69**, 2819-2826.
- DI CORCIA A. & MARCHETTI M. (1991): "Rapid and sensitive determination of phenylurea herbicides in water in the presence of their anilines by extraction with a Carbo-pack cartridge followed by liquid chromatography", *J. Chrom.*, **541**, 365-373.
- KHADRANI A., SEIGLE-MURANDI F., STEIMAN R. & VROUMSIA T. (1999): "Degradation of three phenylurea herbicides (chlortoluron, isoproturon and diuron) by micromycetes isolated from soil", *Chemosphere*, **38**, (13), 3041-3050.
- MANSOUR M., FEICHT E.A., BEHECHTI A. & SCHEUNERT I. (1997): "Experimental approaches to studying the photostability of selected pesticides in water and soil", *Chemosphere*, **35** (1-2), 39-50.
- PIEUCHOT M., PERRIN-GANIER C., PORTAL J.M. & SCHIAVON M. (1996): "Study of the mineralization and degradation of isoproturon in three soils", *Chemosphere*, **33** (3) 467-478.
- POZZONI F. & GUZZELLA L. (2000): "Tecniche di estrazione e concentrazione di fitofarmaci da campioni d'acqua e suolo", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **112**, 46-65.
- RAY T.B. (1984): "Site of action of chlorsulfuron", *Plant Physiology*, **75**, 827-831.
- ROSEN D.J., STRUSZ R.F. & STILL C.C. (1969): "Photolysis of phenylurea herbicides", *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 206-207.
- TANAKA F.S., WIEN R.G. & HOFFER B.L. (1984): "Biphenyl formation in the photolysis of aqueous herbicide solutions", *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **23**, 1-5.
- WALKER A. & WELCH S.J. (1992): "Further studies of the enhanced biodegradation of some soil-applied herbicides", *Weed Res.*, **32**, 19-27.

5060. Prodotti fitosanitari (Antiparassitari, pesticidi)

1. Principio del metodo

Recentemente, per la determinazione dei prodotti fitosanitari nelle acque, sono stati proposti vari metodi multiresidui che utilizzano diverse procedure di estrazione delle sostanze attive e diverse tecniche analitiche.

Poiché tutti questi metodi presentano indubbi vantaggi, nello schema analitico che proponiamo si è ritenuto opportuno lasciare all'operatore una certa discrezionalità nella scelta delle procedure.

Vengono quindi proposte diverse soluzioni, da scegliere anche in funzione della strumentazione disponibile in laboratorio.

Per quanto concerne la procedura di estrazione, potrà essere utilizzata la tecnica liquido/liquido o l'estrazione in fase solida con l'ausilio di supporti di prefiltrazione, in linea con il substrato adsorbente, (quale ad esempio fibra di vetro in polvere) in modo da permettere il passaggio finale dell'eluente. Questo accorgimento è reso necessario dal fatto che la presenza di materiale in sospensione potrebbe creare problemi nell'adsorbimento su fase solida e successiva eluizione (ostruzione parziale o totale durante il passaggio del campione).

Poiché l'analisi di estratti da matrici acquose ha messo in evidenza la possibilità della presenza di composti interferenti, si è ritenuto opportuno prevedere nel metodo un'analisi di conferma. Detta analisi si basa sull'impiego di tecniche di separazione diverse (gascromatografia ed HPLC), di colonne a diversa polarità nell'ambito della stessa tecnica analitica e, qualora sia possibile, per una identificazione più certa, della spettrometria di massa come sistema di rivelazione (GC/MS).

Il metodo descritto nel seguito riguarda un sottoinsieme di sostanze attive (erbicidi azotati) che possono essere determinate in gascromatografia con rivelatore NPD o in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). È possibile l'estensione del presente metodo ad altre sostanze attive, come specificato in Appendice, utilizzando le stesse tecniche di estrazione indicate nel metodo. In essa si riporta anche un cromatogramma esemplificativo, riguardante un'ampia gamma di sostanze attive, compresi gli erbicidi azotati, ottenuto mediante analisi in gascromatografia con rivelazione di massa (GC/MS).

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque di scarico e consente l'analisi degli erbicidi riportati in Tab. 1 con un limite di quantificazione di 1 µg/L, partendo da un campione di 100 mL.

Inoltre, il metodo è applicabile anche alle acque superficiali, sotterranee e potabili e consente l'analisi con un limite di quantificazione, per ciascun analita, di 0,05 µg/L, partendo da un campione di 500-2000 mL.

3. Interferenze e cause di errore

Le più comuni interferenze sinora segnalate, nel caso di analisi con rivelatore selettivo al fosforo ed all'azoto, sono rappresentate dagli insetticidi organofosforici (tipo Parathion, Malathion ecc.), dagli alchil e alchilarilfosfati, dagli aloalchil e aloalchilarilfosfati e dai mercaptobenzotiazoli.

Tabella 1: Erbicidi determinabili con il metodo proposto

Erbicida	Formula bruta	Nome chimico (C.A.)
Atrazina	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina
Atrazina deetilata (metabolita)	C ₆ H ₉ ClN ₅	2-cloro-4-amino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina
Atrazina deisopropilata (metabolita)	C ₆ H ₇ ClN ₅	2-cloro-4-etilamino-6-amino-1,3,5-triazina
Propazina**	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	2-cloro-4,6-bis (isopropilamino)-1,3,5-triazina
Simazina	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	2-cloro-4,6-bis(etilamino)-1,3,5-triazina
Terbutilazina	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	2-cloro-4-etilamino-6-ter-butilamino-1,3,5-triazina
Terbutilazina deetilata (metabolita)	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	2-cloro-4-amino-6-ter-butilamino-1,3,5-triazina
Prometrina	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	2,4-bis (isopropilamino)-6-metiltio-1,3,5-triazina
Cianazina	C ₉ H ₁₃ ClN ₆	2-cloro-4 (1-ciano-1-metiletilamino)-6-etilamino-1,3,5-triazina
Pendimetalin	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	N-(1-etilpropil)-2,6-dinitro-3,4-xilidina
Alaclor	C ₁₄ H ₂ OCINO ₂	2-cloro-2',6'-dietil-N-metossimetil-acetanilide
2,6-dietilanilina (metabolita)	C ₁₀ H ₁₀ N	
Metolaclor	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	2-cloro-6'-etil-N(2-metossi-1-metiletil) acetato-toluidide
2-etil-6-metil-anilina (metabolita)	C ₉ H ₉ N	
Molinate	C ₇ H ₁₇ NOS	S-etil peridroazepina-1-tiocarbossilato
Desmetrina	C ₈ H ₁₅ N ₅ S	2-isopropilamino-4-metilamino-6 metiltio-4,3,5-triazina
Ametrina	C ₉ H ₁₇ N ₅ S	2-etilamino-4-isopropilamino-6-metiltio-1,3,5-triazina
Terbutrina	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	2-terbutilamino-4-etilamino-6-metiltio-1,3,5-triazina

(*) Chemical Abstracts

(**) Sostanza attiva non autorizzata in Italia

In particolare gli esteri fosforici sono molto diffusi e possono essere causa di contaminazione anche attraverso i materiali di laboratorio.

Per eliminare l'interferenza di molti di questi composti (alchil ed aloalchilfosfati, ecc.) si può effettuare l'analisi in HPLC, dal momento che essi non vengono rivelati in UV.

Per campioni particolarmente complessi è possibile operare la purificazione e frazionamento dell'estratto su microcolonna di gel di silice, secondo la procedura proposta da Leoni e collaboratori.

4. Campionamento e conservazione del campione

I campioni vengono prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, con chiusura a smeriglio oppure a vite.

Essi debbono essere conservati in frigorifero fino al momento dell'estrazione, che deve essere eseguita preferibilmente entro 48 ore dal prelievo.

5. Apparecchiature

5.1 Gascromatografo

Si consiglia l'uso di colonne capillari e sistemi di iniezione "on column" o "split/splitless". In Tab. 2 si riportano, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'analisi in gascromatografia.

Colonna:	metilfenilsilicone (es. SPB5, PS 255, o equivalente)
Colonna di conferma:	vinilsilicone (es. OV 1701, o equivalente)
Dimensioni colonna:	l = 25-30 m, d.i.=0,32 mm, spessore film=0,25-0,35 µm l = 30 m, d.i.=0,25 mm, spessore film=0,25 µm
Iniettore:	"on column" (le modalità di iniezione dipendono dalle caratteristiche costruttive dell'iniettore, comunque in genere si inietta al massimo 1 µL oppure: "split/splitless" ("splitless" valvola chiusa per 60 sec), temp. 250°C
Rivelatore:	-tipo: rivelatore azoto-fosforo (nitrogen-phosphorous detector NPD) -temp.: 250°C -flussi: idrogeno e aria secondo il rapporto suggerito dal costruttore (di solito da 1:10 a 1:20)
Gas di trasporto:	elio
Gas ausiliario:	elio o azoto; flusso: 30 mL/min (o secondo specifiche rivelatore)
Temperatura colonna:	programma: 80°C per 1 min, 15°C/min fino a 150°C, 150°C per 1 min, 3°C/min fino a 220°C, 220°C per 1 min, 20°C/min fino a 280°C (o altro programma di temperatura del quale si verifichi l'idoneità)

5.2 HPLC

Si consiglia l'uso di uno strumento dotato di rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile e di colonne a fase inversa del tipo C₁₈ o C₈ (per la messa a punto del metodo è stata utilizzata una colonna C₁₈ di lunghezza 15 cm, diametro interno 4,6 mm, diametro particelle 5 µm).

Colonna:	C ₁₈ (5 µm); l=15 cm
Miscela eluente:	metanolo:acetonitrile:acqua (40:20:40)
Flusso:	1 mL/min
Lunghezza d'onda rivelatore UV:	220 nm

5.3 *Evaporatore rotante*, con possibilità di operare con il vuoto, con bagno termostatico ed opportuno sistema per il recupero dei solventi.

5.4 Colonne cromatografiche

Colonne cromatografiche in vetro (h=30 cm, d.i.=4,2 mm) con parte inferiore sfinata (h=3,5 cm, d.i.=2 mm) e serbatoio solventi avente una capacità di circa 40 mL.

5.5 *Provette da concentrazione in vetro ("vials")*, da 5 mL, 10 mL, 15 mL e 25 mL, preferibilmente con gambo sfinato graduato a 0,5 mL ed 1 mL.

5.6 Normale vetreria di laboratorio

Dopo il lavaggio, la vetreria deve essere sciacquata con acqua bidistillata ed infine con acetone, prima dell'uso.

6. Reattivi

6.1 *Diclorometano* (tipo per determinazione residui pesticidi).

6.2 *Etilacetato* (tipo per determinazione residui pesticidi).

6.3 *Acetonitrile (per HPLC)*

6.4 *Metanolo (per HPLC)*

6.5 *Acqua (per HPLC)*

6.6 *Sodio solfato anidro (tipo granulare per analisi di pesticidi).*

Il prodotto va tenuto in muffola per almeno 3 ore a 550°C e successivamente conservato in contenitore di vetro a chiusura ermetica (precedentemente lavato come descritto sopra per la vetreria).

6.7 *Adsorbenti per l'estrazione SPE*

Costituiti da silice legata a catene a 8 o 18 atomi di carbonio, resine stirene divinilbenzene, su supporti a disco o in cartucce, e cartucce di carbone grafitato. La procedura di condizionamento, estrazione ed eluizione viene effettuata sotto vuoto, secondo le modalità riportate in bibliografia, montando il supporto del materiale adsorbente su una beuta da vuoto o su un sistema multiplo per estrazione liquido-solido, disponibile in commercio.

6.8 *Filtri in fibra di vetro o polvere di vetro, con particelle da 40 µm di diametro, da utilizzare per la filtrazione in linea delle acque contenenti solidi sospesi particellari o colloidali.*

6.9 *Soluzioni di riferimento di erbicidi*

Le sostanze attive, preferibilmente certificate o garantite, devono avere una purezza superiore al 98%.

6.9.1 *Per analisi con tecniche gascromatografiche*

Preparare le soluzioni di riferimento concentrate pesando 10 mg di ognuna delle sostanze attive costituenti la miscela, trasferendole in matraccio tarato (100 mL) e portando a volume con etilacetato o metanolo. Queste soluzioni possono essere conservate in frigorifero per tre mesi (ricontrollando gravimetricamente l'eventuale evaporazione del solvente).

Le soluzioni di riferimento diluite, a concentrazione di circa 0,2 ng/µL, 0,5 ng/µL, 1 ng/µL e 2 ng/µL, vengono ottenute per diluizioni successive delle soluzioni di riferimento concentrate impiegando come solvente sempre l'etilacetato. È preferibile che queste soluzioni siano preparate almeno una volta al mese o al momento dell'uso.

Si suggeriscono le seguenti miscele che tengono conto dei tempi di ritenzione relativi alle colonne consigliate:

A) Metilfenilsilicone	B) Metilfenilsilicone	C) Vinilsilicone
Molinate	Simazina	Atrazina
Atrazina deetilata	Atrazina	[Tris-2-cloroetilfosfato]
Terbutilazina deetilata	Terbutilazina	Alaclor
Propazina	Prometrina	Cianazina
Desmetrina	Alaclor	Atrazina deisopropilata
Ametrina	Metolaclor	Metolaclor
Terbutrina	Pendimetalin	2,6-dietilanilina
		2-etil-6-metilanilina

6.9.2 *Per analisi in HPLC*

Preparare le soluzioni di riferimento concentrate pesando 10 mg di ognuna delle sostanze attive, trasferendole in matraccio tarato (100 mL) e portando a volume con metanolo. Queste soluzioni possono essere conservate in frigorifero per tre mesi (ricontrollando gravimetricamente la eventuale evaporazione del solvente).

Le soluzioni di riferimento diluite, a concentrazione di circa 0,2 ng/ μ L, 0,5 ng/ μ L, 1 ng/ μ L e 2 ng/ μ L, vengono ottenute per diluizioni successive delle soluzioni concentrate sempre con metanolo. È preferibile che queste soluzioni siano preparate al momento dell'uso e comunque conservate in frigorifero per non più di un mese.

7. Procedimento

7.1 Estrazione liquido/liquido del campione

Trasferire 100 mL di campione d'acqua di scarico in un imbuto separatore da 250 mL ed estrarli per tre volte con diclorometano (50 + 25 + 25 mL), agitando energicamente ogni volta per 3 minuti. Nel caso di acque superficiali o potabili l'estrazione avviene in una bottiglia di vetro scuro da 2,5 L e successivamente il suo contenuto è trasferito in un imbuto separatore da 2,5 L. Lasciar poi separare le fasi raccogliendo gli estratti (filtrati su circa 20 g di solfato di sodio anidro) in un pallone da concentrazione. Evaporare poi in evaporatore rotante su bagno termostatico (40-45°C) e sotto vuoto leggero fino a circa 5 mL; quindi trasferire l'estratto nella provetta da concentrazione.

- a) Analisi gascromatografiche: aggiungere nella provetta 1 mL di etilacetato e concentrare sino a circa 0,5 mL sotto moderato flusso di azoto, portando poi a 1 mL con etilacetato.
- b) Analisi in HPLC: completare l'evaporazione sino quasi a secchezza sotto moderato flusso di azoto e riprendere poi portando al volume di 1 mL con metanolo.
Particolari cautele nella concentrazione degli estratti vanno prese quando si accerti la presenza di Molinate. Infatti considerevoli perdite dello stesso possono verificarsi durante la fase di concentrazione dell'estratto. Si consiglia quindi di evitare di portare a secco, concentrando nelle condizioni meno drastiche possibili.

7.2 Estrazione in fase solida del campione

Per questo tipo di estrazione, possono essere utilizzate resine stirene-divinilbenzene (SDVB), substrati octil o octadecilsilanici e carbone grafitato.

Le condizioni tipiche di estrazione prevedono per le acque sotterranee e superficiali un fattore di concentrazione di 1000 partendo da un volume di 500-2000 mL di campione. Nel caso di campioni contenenti materiale in sospensione, è consigliabile utilizzare filtri in fibra di vetro o polvere di vetro in linea al substrato adsorbente, in modo tale da effettuare una preventiva filtrazione del particolato che potrebbe intasare il substrato stesso e da consentirne l'estrazione all'atto del passaggio dell'eluente (acetato di etile, metanolo, miscela diclorometano-metanolo).

Concentrare il solvente sotto debole corrente d'azoto a temperatura non superiore a 40°C e riprendere con il solvente più adatto al tipo di analisi cromatografica da condurre.

In Fig. 1 è riportata una tipica separazione gas cromatografica di erbicidi azotati, estratti da un campione di acqua superficiale utilizzando un substrato a base di resina stirene-divinilbenzene.

7.3 Analisi cromatografiche

7.3.1 Gascromatografia

In Tab. 4 sono riportati i tempi di ritenzione, relativi all'atrazina, degli erbicidi considerati in questo metodo e di altre sostanze che potrebbero interferire nelle determinazioni (tra parentesi in tabella: pesticidi organofosforici, alchilarilfosfati e aloalchilarilfosfati).

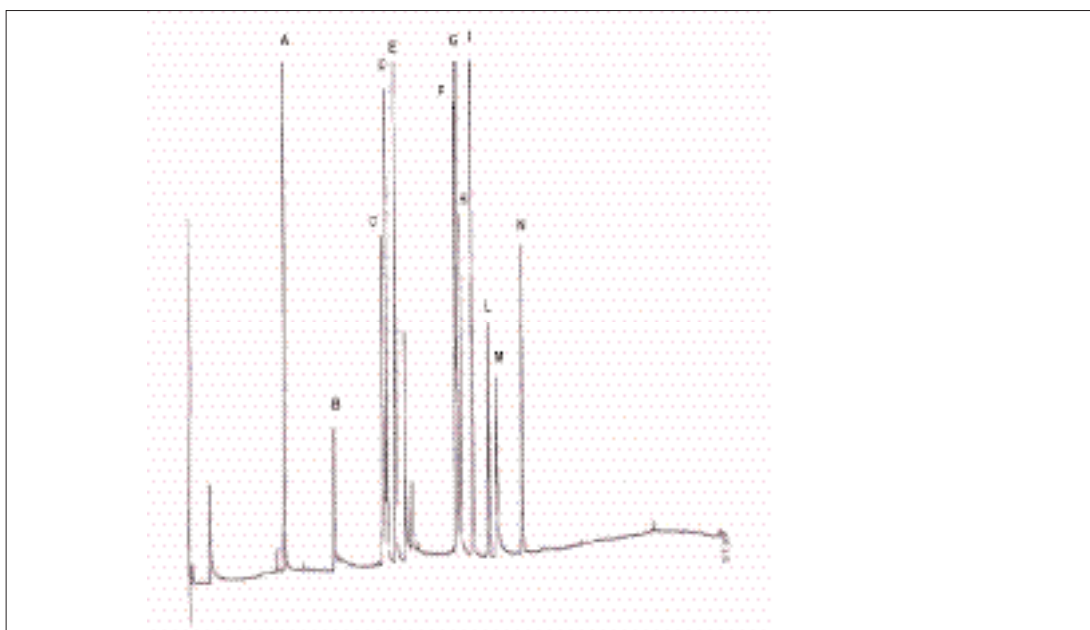


Figura 1: Gas cromatogramma ottenuto da 1 L di acqua superficiale contaminata con 1 µg/L degli erbicidi azotati indicati in Tab. 1, ad eccezione della deisopropilatrazina, mediante estrazione con resina stirene-divinilbenzene su disco in fibra di vetro. Condizioni gascromatografiche: colonna HP-5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, "carrier" elio a 30 mL/min misurato a 50°C, temperatura iniettore 250°C, temperatura rivelatore NPD 270°C, temperatura iniziale 50°C per 2 min, rate A: 6°C/min fino a 140°C, rate B: 3°C/min fino a 230°C, rate C: 8°C/min fino a 290, temperatura finale 290°C per 2 min. A=molinate; B=desetilatrazina; C=atrazina; D=propazina; E=terbutilazina; F=alaclor; G=ametrina; H=prometrina; I=terbutrina; L=metolaclor; M=cianazina; N=pendimetalin.

Tabella 4: Tempi di ritenzione di erbicidi e di altri composti relativi all'atrazina*

Erbicidi ed altri composti	Colonne	
	OV 1701	SPB -5
2-etil-6-metilnilina	0,541	-
2,6-dietilnilina	0,598	-
(tri-iso-butilfosfato)	0,720	0,750
molinate	0,728	0,790
(tri-n-butilfosfato)	0,833	0,872
(forate)	0,879	0,967
(diazinone)	0,952	1,074
atrazina deetilata	0,952	0,900
atrazina deisopropilata	0,956	-
terbutilazina deetilata	0,966	-
Propazina	0,993	1,012
atrazina*	1 ^a	1 ^b
simazina	1,006	0,986
desmetrina	-	1,181
ametrina	-	1,247
terbutrina	-	1,298
(tris-monocloroisopropilfosfato)	1,06; 1,10; 1,12	1,05; 1,07; 1,072
(tris-2cloroetilfosfato)	1,092	0,988
(malation)	1,099	1,313
terbutilazina	1,015	1,042
alaclor	1,129	1,230
prometrina	1,131	1,250

segue

segue

Erbicidi ed altri composti	Colonne	
	OV 1701	SPB -5
metolaclo	1,213	1,399
(metilparathion)	1,233	1,215
pendimetalin	1,296	1,511
(paration)	1,299	1,378
cianazina	1,498	>2

a) circa 10 minuti; b) circa 20 minuti.

Per le condizioni generali cromatografiche si fa riferimento al Paragrafo (5.1), mentre nelle didascalie delle Fig. 2-4 sono indicate le specifiche condizioni utilizzate. Come già detto è consigliabile procedere sempre ad analisi di conferma impiegando una colonna di differente polarità.

Le Fig. 2-4 riportano i gascromatogrammi di miscele di riferimento di erbicidi in diverse condizioni operative e con differenti fasi stazionarie. Dette figure possono rappresentare inizialmente un punto di riferimento per l'operatore per scegliere le condizioni di lavoro più opportune al suo specifico problema.

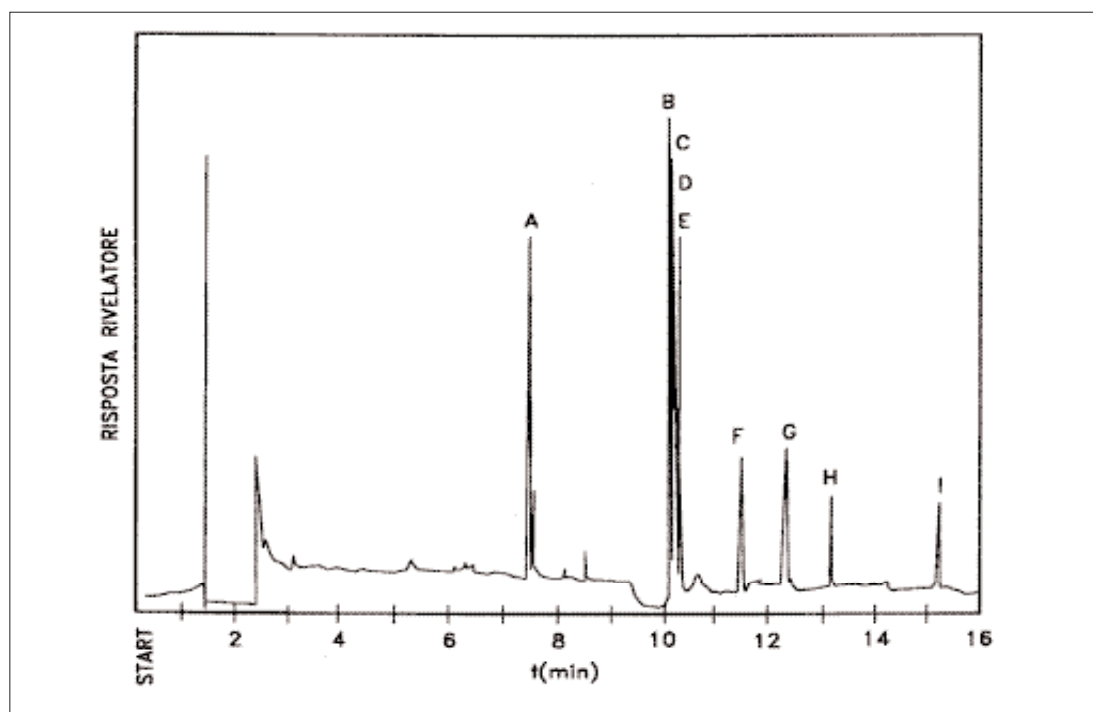


Figura 2: Gascromatogramma di una soluzione di riferimento di erbicidi su una colonna capillare OV 1701 (l=25 m, d.i.=0,32 mm). Condizioni operative: gas di trasporto = elio a 1 mL/min; temperatura programmata = 70→210°C, a 20°C/min e 210→250°C, a 4°C/min (A=molinate, B=propazina, C=atrazina, D=simazina, E=terbutilazina, F=alaclo, G=metolaclo, H=pendimetalin, I=cianazina).

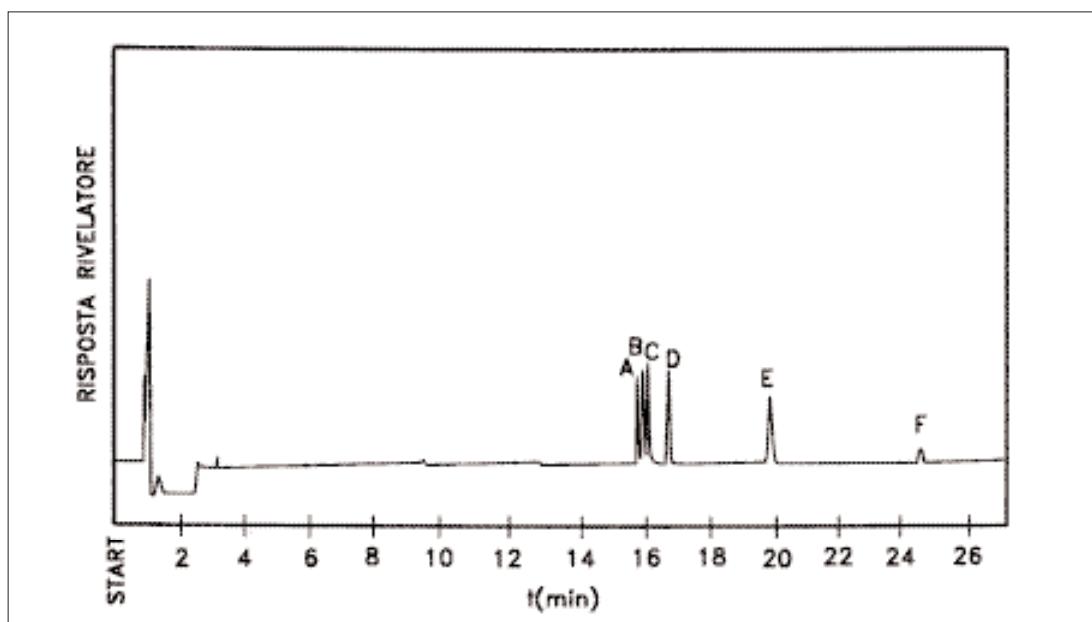


Figura 3: Gascromatogramma di erbicidi su colonna PS 255 ($l=25$ m, d.i.=0,32 mm). Condizioni operative: gas di trasporto = elio a 1 mL/min; temperatura programmata = $70 \rightarrow 210^\circ\text{C}$, a $20^\circ\text{C}/\text{min}$ e $210 \rightarrow 250^\circ\text{C}$, a $4^\circ\text{C}/\text{min}$ (A=simazina, B=atrazina, C=propazina, D=terbutilazina, E=prometrina, F=pendimetalin).

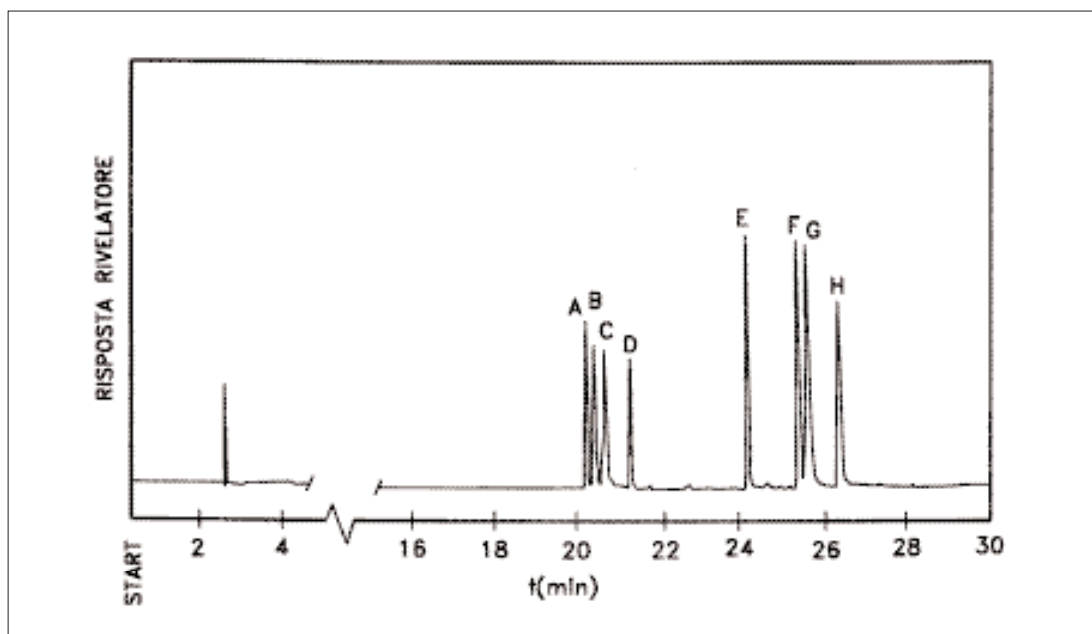


Figura 4: Gascromatogramma di erbicidi su colonna SBP ($l=30$ m, d.i.=0,32 mm, spessore film=0,25 μm). Condizioni operative: 80°C per 1 min; $80 \rightarrow 150^\circ\text{C}$, $15^\circ\text{C}/\text{min}$; 150°C per 1 min; $150 \rightarrow 220^\circ\text{C}$, $3^\circ\text{C}/\text{min}$; 220°C per 1 min; $220 \rightarrow 280^\circ\text{C}$, $20^\circ\text{C}/\text{min}$ (A=simazina, B=atrazina, C=propazina, D=terbutilazina, E=desmetrina, F=ametrina, G=prometrina, H=terbutrina).

Utilizzando colonne capillari con fase stazionaria metilfenilsiliconica (SPB 5 o equivalente) si possono separare praticamente tutte le sostanze di interesse; tuttavia, per permettere una buona risoluzione delle triazine dal tris-2-cloroetilfosfato, un contaminante molto diffuso, è conveniente utilizzare anche la colonna di conferma con fase vinilsiliconica (OV 1701 o equivalente).

7.3.2 Cromatografia liquida (HPLC)

In Tab. 5 sono riportati i fattori di capacità (k') su colonna a fase inversa (C_{18}) in HPLC nelle condizioni descritte nel Capitolo 5. Le Fig. 5 e 6 mostrano tipiche separazioni di erbicidi su colonne (C_{18}).

Tabella 5: Fattori di capacità (k') in HPLC *

Principio attivo	Fattori di capacità (k')
Atrazina deisopropilata	0,423
Atrazina deetilata	0,686
Terbutilazina deetilata	0,832
Simazina	1,372
Cianazina	1,385
Atrazina	2,109
Propazina	3,277
Terbutilazina	3,839
Prometrina	6,956
Alaclor	6,293
Metolaclor	6,827

* I k' sono stati calcolati rispetto al tempo di ritenzione della formammide (1,37 min)

8. Calcoli

Si può utilizzare il metodo del riferimento esterno iniettando volumi uguali di campione e di riferimento.

Preparare opportune miscele di riferimento delle sostanze attive (vedi Paragrafo 6.9), di composizione tale da non provocare sovrapposizioni di picchi ed a concentrazioni di circa 0,2 ng/ μ L, 0,5 ng/ μ L, 1 ng/ μ L e 2 ng/ μ L per ogni singola sostanza attiva.

Ricavare quindi le curve di taratura per le singole sostanze attive calcolando i fattori di risposta e accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento.

9. Qualità del dato

La Tab. 6 riporta i risultati di alcune prove di recupero di miscele di erbicidi addizionati a campioni di acqua, mediante piccoli volumi di soluzioni di riferimento di essi, preparate in acetone in modo da avere concentrazioni comprese tra 0,1 μ g/L e 2,0 μ g/L. I dati, ottenuti mediante determinazioni gascromatografiche, si riferiscono a prove condotte su campioni di un litro di acqua potabile, estratto per tre volte con diclorometano (100 + 50 + 50 mL).

Per quanto concerne i dati di precisione ed accuratezza relativi alla procedura che impiega l'estrazione in fase solida, si rimanda ai riferimenti bibliografici.

Nota: si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".

Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

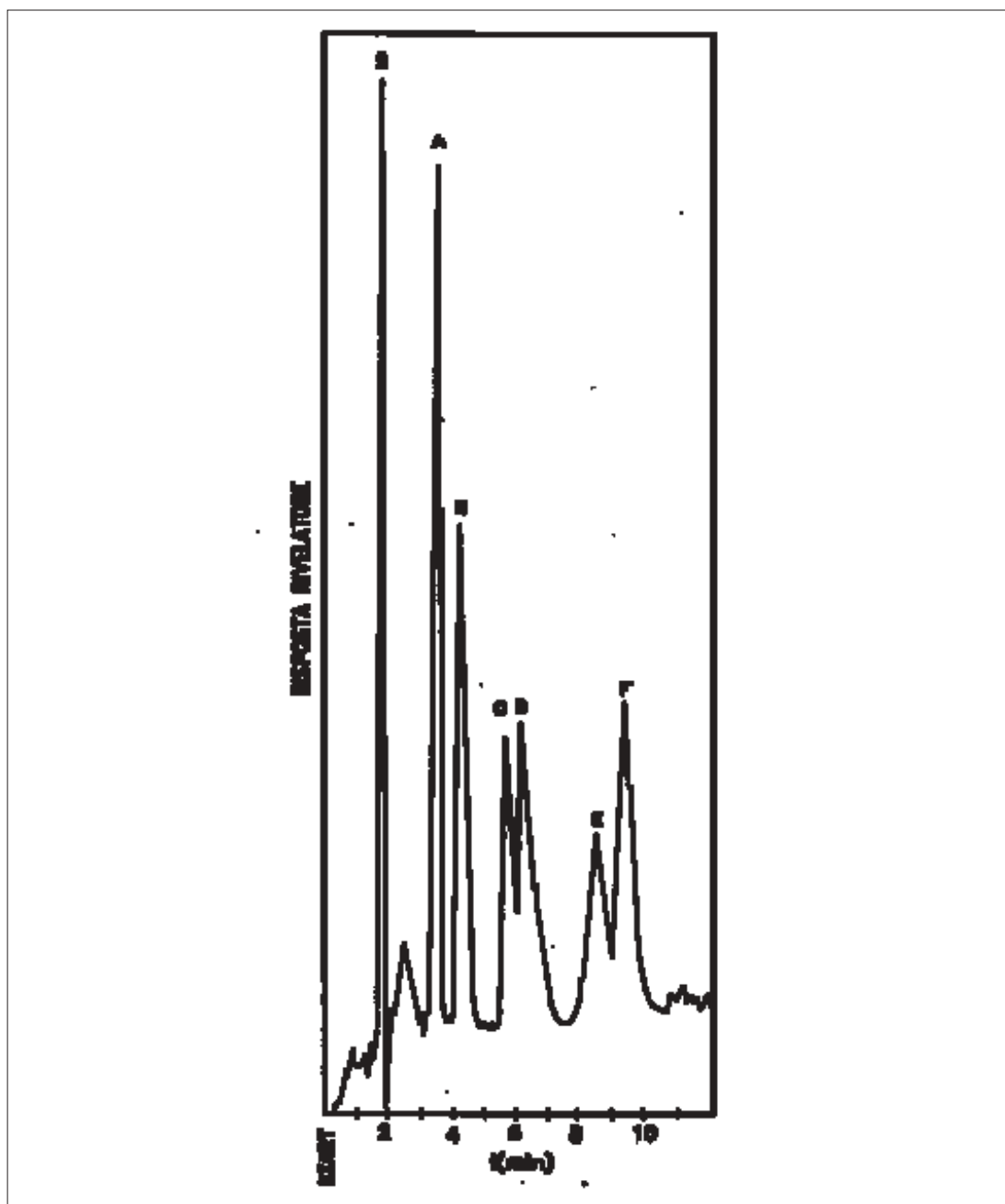


Figura 5: Cromatogramma HPLC di una miscela di sei erbicidi in metanolo (S) su colonna C18; l=15 cm, fase mobile: metanolo-acetonitrile-acqua (40:20:40). A=simazina; B=atrazina; C=propazina; D=terbutilazina; E=alaclor; F=metolaclor.

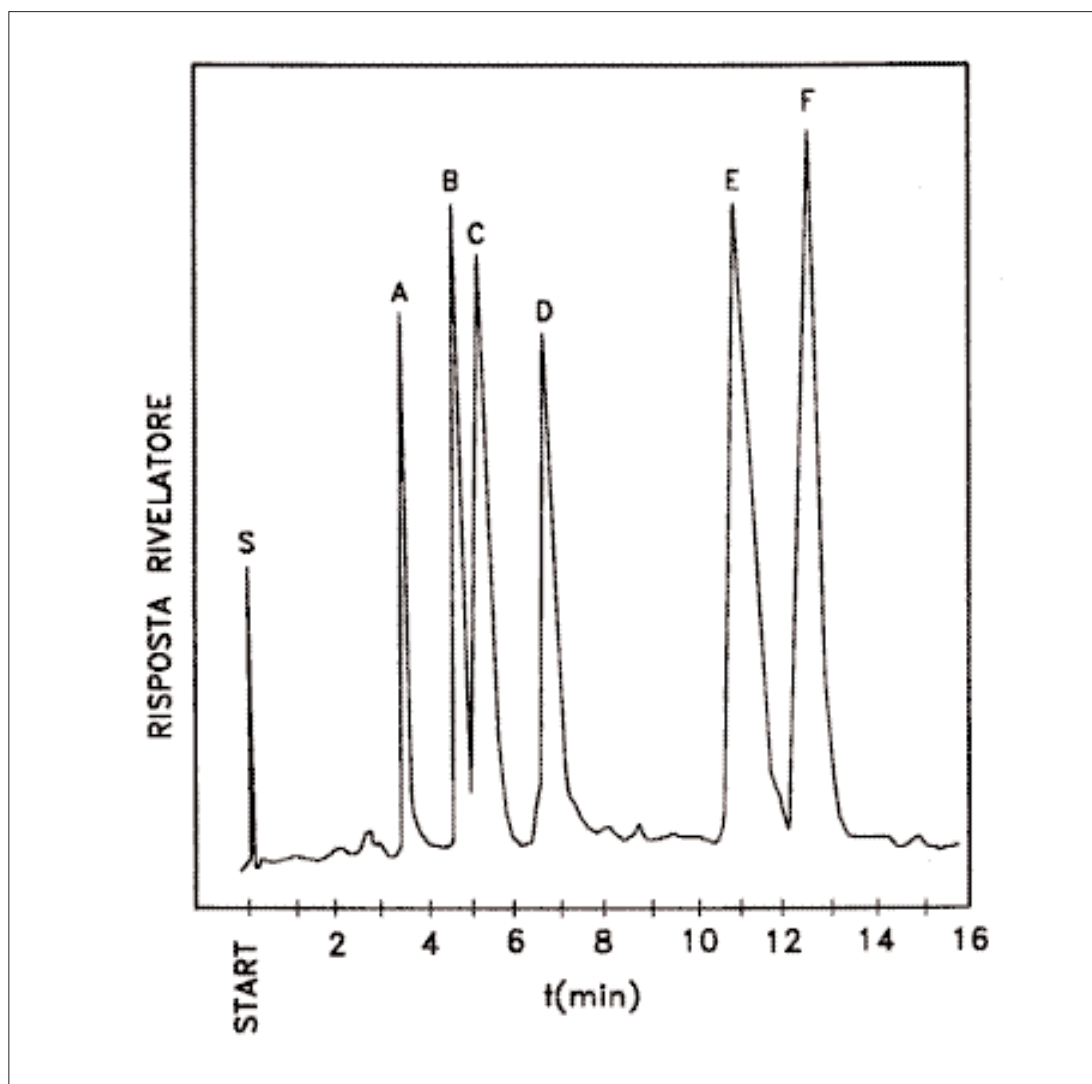


Figura 6: Cromatogramma HPLC di una miscela di sei triazine in metanolo (S) su colonna C18, l=15 cm, fase mobile: acqua-metanolo (65:35), flusso: 0,5 mL/min. A=simazina, B=atrazina, C=desmetrina, D=propazina, E=prometrina F=terbutrina.

Tabella 6: Valori % medi (n=3) ottenuti nelle prove di recupero

Principio attivo	0,1 µg/L	0,2 µg/L	0,5 µg/L	1,0 µg/L	2,0 µg/L
Atrazina	105,0	90,3	94,6	94,7	80,2
Simazina	91,6	93,9	103,4	96,5	91,7
Ametrina	87,1	97,7	103,1	96,7	102,5
Molinate		86,5	73,5	70,8	
Terbutrina		90,8	92,5	91,4	
Propazina		87,3		87,0	
Terbutilazina		103,5		104,2	
Trifluralin		88,0		88,9	
Desmetrina				99,8	
Prometrina				103,3	
Cianazina				97,5	
Clorsulfuron				100,7	
Alaclor				100,3	

BIBLIOGRAFIA

AKERBLOM M. & JONSALL G. (1990): "Multiresidue determination of pesticides in water", in: *Proceedings of the 7th International Congress of Pesticide Chemistry*, Hamburg, August.

BRANCA P. & QUAGLINO P. (1989): "Determinazione rapida di pesticidi organofosforati e diserbanti triazinici in acque ed alimenti", *Boll. Chim. Igien.*, **40**, 71-78 .

BROOKS M.W. et al. (1989): "Rapid Method for the Determination of Alachlor, Atrazine and Metholachlor in Groundwater by Solid-phase Extraction", *Analyst*, **11**, 405-406.

DAVÌ M.L. et al. (1999): "Multiresidue analysis of organic pollutants in water by SPE with a C8 and SDVB combined cartridge", *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **74**, 155-166.

DI CORCIA A., MARCHETTI M., CAPRI S. & LIBERATORI A. (1989): "Dosaggio di pesticidi nelle acque: estrazione per mezzo di una cartuccia di Carbo-pack B e quantificazione mediante HPLC", *IRSA-Notiziario Metodi Analitici per le Acque*, **9**(3), 43-55.

GALASSI S., BONIARDI N. & DE PAOLIS A. (1990): "Metodi multiresidui per l'analisi di erbicidi nelle acque", *Boll. Chim. Igien.*, **41**, 405-413.

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (2000): "Metodi Analitici per le acque destinate al consumo umano", volume II, Rapporti Istituzionali 00/14, Pt. 1, 3-14.

LEONI V., CREMISINI C., CASUCCIO A. & GULLOTTI A. (1991): "The separation of Pesticides, Related Compounds, Polychlorobiphenyls and Other Pollutants in Four Groups by Silica-Gel Microcolumn Chromatography (Application to Surface Water Analysis)", *Pestic. Sci.*, **31**, 209-220.

PERUZZI M., BARTOLUCCI G. & CIONI F. (2000): "Determination of phenoxyalkanoic acids and other herbicides at the ng/ml level in water by solid-phase extraction with poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) sorbent and high-performance liquid chromatography-diode-array detection", *J. Chromatogr., A*, **867**, 169-175.

POPL M. et al. (1983): "Determination of Triazines in Water by GC and LC", *J. Chromatogr. Sci.*, **21**, 39-42.

STEINHEIMER T.R. & BROOKS M.G. (1984): "Development and Evaluation of a Gas Chromatographic Method for the Determination of Triazine Herbicides in Natural Water Samples", *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **17**, 97-111.

UNICHIM (1988): "Metodo di analisi di residui di Atrazina e simili e di Molinate nelle acque potabili", in: *Atti del Convegno sulle Acque per Uso Potabile*, Milano, 214-218.

VIETTI L. et al. (1986): "Proposta di metodo multiresidui per la determinazione di pesticidi nelle acque potabili", *Boll. Chim. Igien.*, **37**, 359-365.

APPENDICE

Il presente metodo può essere applicato per la determinazione in acqua mediante GC-NPD, GC-ECD e GC-MS SIM delle sostanze attive riportate in Tab. 7, che rappresentano un discreto numero dei più comuni insetticidi, erbicidi, fungicidi ed acaricidi. Le condizioni gascromatografiche devono essere adeguate ai composti che si vogliono determinare. In Tab. 7, per ogni sostanza, sono riportate le sensibilità nei confronti dei rivelatori selettivi ed indicati gli ioni più significativi per l'analisi mediante spettrometria di massa.

COSTITUENTI ORGANICI

In Fig. 7 si riporta anche un cromatogramma esemplificativo, riguardante un'ampia gamma di sostanze attive, compresi gli erbicidi azotati, ottenuto mediante analisi in gascromatografia con rivelazione di massa (GC/MS).

Tabella 7: Sensibilità ai rivelatori selettivi e ioni più significativi (per l'analisi in GC/MS) di alcuni antiparassitari

Sostanza attiva	CAS	Formula	P.M.	Rivelatore			ioni			
				NPD	ECD	MS				
Alaclor	15972-60-8	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	269	X	X	X	160	188	146	238
Aldrin	309-00-2	C ₁₂ H ₈ Cl ₆	362	O	X	X	66	261	263	265
Alfametrina	67375-30-8	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	415	X	X	X	163	165	181	209
Ametrina	834-12-8	C ₉ H ₁₇ N ₅ S	227	X	O	X	227	212	170	185
Atrazina	1912-24-9	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215	X	X	X	200	202	215	217
Azinfos-Etile	2642-71-9	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂	345	X	X	X	132	160	77	105
Azinfos-Metile	86-50-0	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂	317	X	X	X	77	160	132	105
Benalaxil	71626-11-4	C ₂₀ H ₂₃ NO ₃	325	X	O	X	148	206	204	176
Benfluralin	1861-40-1	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	335	X	X	X	292	264	145	318
Benzoilprop Etile	22212-55-1	C ₁₈ H ₁₇ Cl ₂ NO ₃	365	X	X	X	105	77	292	
Bitertanolo	55179-31-2	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂	337	X	X	X	170	168	171	112
Bromofos-Etile	4824-78-6	C ₁₀ H ₁₂ BrCl ₂ O ₃ PS	392	X	X	X	357	359	301	303
Bromofos-Metile	2104-96-3	C ₈ H ₈ BrCl ₂ O ₃ PS	364	X	X	X	329	331	333	125
Bromopropilato	18181-80-1	C ₁₇ H ₁₆ Br ₂ O ₃	426	O	X	X	339	341	183	185
Carbofenotion	786-19-6	C ₁₁ H ₁₆ ClO ₂ PS ₃	342	X	X	X	157	159	121	153
Carbofuran	1563-66-2	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221	X	X	X	164	149	122	121
Cianazina	21725-46-2	C ₉ H ₁₃ ClN ₆	240	X	X	X	225	227	172	198
Cicloate	1134-23-2	C ₁₁ H ₂₁ NOS	215	X	O	X	83	154	215	
Clorfenson	80-33-1	C ₁₂ H ₈ Cl ₂ O ₃ S	302	O	X	X	175	177	111	113
Clorfenvinfos	470-90-6	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P	358	X	X	X	267	269	323	325
Clorotalonil	1897-45-6	C ₈ Cl ₄ N ₂	264	X	X	X	264	266	268	133
Clorpirifos	2921-88-2	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	349	X	X	X	197	199	314	316
Clorpirifos-Metile	5598-13-0	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	321	X	X	X	286	288	125	109
Clorprofam	101-21-3	C ₁₀ H ₁₂ ClNO ₂	213	X	X	X	127	129	213	215
Clortal Dimetile	1861-32-1	C ₁₀ H ₆ Cl ₄ O ₄	330	O	X	X	299	301	303	332
Clortoluron	15545-48-9	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O	212	X	X	X	72	212	214	
DDD op'	53-19-0	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	318	O	X	X	235	237	165	199
DDD pp'	72-54-8	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	318	O	X	X	235	237	165	199
DDE op'	3424-82-6	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	316	O	X	X	246	248	316	318
DDE pp'	72-55-9	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	316	O	X	X	246	248	316	318
DDT op'	784-02-6	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	352	O	X	X	235	237	165	199
DDT pp'	50-29-3	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	352	O	X	X	235	237	165	199
Diazinone	333-41-5	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	304	X	X	X	179	137	152	304
Diclobenil	1194-65-6	C ₇ H ₃ Cl ₂ N	171	X	X	X	171	173	100	136
Diclofluanide	1085-98-9	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂	332	X	X	X	123	167	224	226
Dioldrin	60-57-1	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	378	O	X	X	79	263	277	237
Dimetacolor	50563-36-5	C ₁₃ H ₁₈ ClNO ₂	255	X	X	X	134	197	199	
Dinitramina	29091-05-2	C ₁₁ H ₁₃ F ₃ N ₄ O ₄	322	X	X	X	305	307	261	232
Endosulfan alfa	959-98-7	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	404	O	X	X	195	237	239	241
Endosulfan Beta	33213-65-3	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	404	O	X	X	195	237	239	241
Endosulfan Solfato	1031-07-8	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₄ S	420	O	X	X	270	272	274	237
Endrin	72-20-8	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O	378	O	X	X	261	263	265	243
Eptacloro	76-44-8	C ₁₀ H ₅ Cl ₇	370	O	X	X	100	270	272	274
Eptenofos	23560-59-0	C ₉ H ₁₂ ClO ₄ P	250	X	X	X	124	126	89	215

segue

COSTITUENTI ORGANICI

segue

Sostanza attiva	CAS	Formula	P.M.	Rivelatore			ioni			
				NPD	ECD	MS				
Esaconazolo	79983-71-4	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O	313	X	X	X	83	214	216	231
Etion	563-12-2	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	384	X	X	X	97	231	153	125
Etoprofos	13194-48-4	C ₈ H ₁₉ O ₃ PS ₂	242	X	X	X	158	97	126	200
Fenamifos	22224-92-6	C ₁₃ H ₂₂ NO ₃ PS	303	X	O	X	154	303	217	260
Fenarimol	60168-88-9	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	330	X	X	X	139	141	251	253
Fenclorfos	299-84-3	C ₈ H ₈ Cl ₃ O ₃ PS	320	X	X	X	285	287	125	109
Fenitroton	122-14-5	C ₉ H ₁₂ NO ₃ PS	277	X	X	X	125	109	277	260
Fenson	80-38-6	C ₁₂ H ₉ ClO ₃ S	268	O	X	X	77	141	268	270
Fention	55-38-9	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	278	X	O	X	278	125	109	169
Fentoato	2597-03-7	C ₁₂ H ₁₇ O ₄ PS ₂	320	X	X	X	274	125	121	93
Flamprop Isopropile	52756-22-6	C ₁₉ H ₁₉ ClFNO ₃	363	X	X	X	105	77	276	
Fluvalinate	69409-94-5	C ₂₆ H ₂₂ ClF ₃ N ₂ O ₃	502	X	X	X	250	252	209	181
Forate	298-02-2	C ₇ H ₁₇ O ₂ PS ₃	260	X	X	X	75	121	97	93
Fosalone	2310-17-0	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂	367	X	X	X	182	184	121	97
Fosfamidone	13171-21-6	C ₁₀ H ₁₉ ClNO ₃ P	299	X	X	X	127	264	72	138
Fosmet	732-11-6	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂	317	X	X	X	160	161	104	76
Furalaxil	57646-30-7	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	301	X	O	X	95	242	152	
Iprodione	36734-19-7	C ₁₃ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₃	329	X	X	X	314	316	187	189
Isofenfos	25311-71-1	C ₁₅ H ₂₄ NO ₄ PS	345	X	X	X	213	121	185	255
Isopropalin	33820-53-0	C ₁₅ H ₂₃ N ₃ O ₄	309	X	X	X	280	238	264	309
Lindano	58-89-9	C ₆ H ₆ Cl ₆	288	O	X	X	181	183	217	219
Linuron	330-55-2	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	248	X	X	X	61	248	250	160
Malation	121-75-5	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330	X	X	X	127	125	173	158
Metalaxil	57837-19-1	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	279	X	O	X	206	160	192	132
Metazaclor	67129-08-2	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O	277	X	X	X	81	132	133	134
Metidation	950-37-8	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	302	X	X	X	145	85	93	125
Metabenzitiazuron	18691-97-9	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ OS	221	X	O	X	164	135		
Metobromuron	3060-89-7	C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₂	258	X	X	X	61	258	260	170
Metolaclor	51218-45-2	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	283	X	X	X	162	238	240	146
Metoprotrina	841-06-5	C ₁₁ H ₂₁ N ₅ OS	271	X	O	X	256	213	226	271
Miclobutanil	88671-89-0	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	288	X	X	X	179	181	150	152
Molinate	2212-67-1	C ₉ H ₁₇ NOS	187	X	O	X	126	55	83	187
Nitrotal Isopropile	10552-74-6	C ₁₄ H ₁₇ NO ₆	295	X	X	X	236	194	212	254
Nuarimol	63284-71-9	C ₁₇ H ₁₂ ClFNO ₂ O	314	X	X	X	235	237	314	316
Oxadiazon	19666-30-9	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₃	344	X	X	X	175	177	258	262
Oxadixil	77732-09-3	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄	278	X	X	X	163	132	233	118
Oxifluorfen	42874-03-3	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄	361	X	X	X	252	361	363	300
Paration	56-38-2	C ₁₀ H ₁₄ NO ₃ PS	291	X	X	X	97	109	291	139
Paration-Metile	298-00-0	C ₈ H ₁₀ NO ₃ PS	264	X	X	X	109	125	263	93
Penconazolo	66246-88-6	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃	283	X	X	X	159	161	248	250
Pendimetalin	40487-42-1	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	281	X	X	X	252	162	192	281
Permetrina	52645-53-1	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	390	O	X	X	183	163	165	127
Pirazofos	13457-18-6	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	373	X	X	X	221	232	237	373
Piridafention	119-12-0	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₄ PS	340	X	X	X	199	340	125	188
Pirimicarb	23103-98-2	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	238	X	O	X	166	72	238	123
Pirimifos-Metile	29232-93-7	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	305	X	X	X	290	276	305	233
Procimidone	32809-16-8	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	283	X	X	X	96	67	283	285
Procloraz	67747-09-5	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	375	X	X	X	144	130	145	102
Profam	122-42-9	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	179	X	O	X	93	179	137	120

segue

COSTITUENTI ORGANICI

segue

Sostanza attiva	CAS	Formula	P.M.	Rivelatore			ioni			
				NPD	ECD	MS				
Profenofos	41198-08-7	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	372	X	X	X	206	208	139	339
Prometon	1610-18-0	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O	225	X	O	X	210	225	183	168
Prometrina	7287-19-6	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	241	X	O	X	184	241	226	199
Propaclor	1918-16-7	C ₁₁ H ₁₄ ClNO	211	X	X	X	120	176	211	213
Propazina	139-40-2	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	229	X	X	X	214	216	229	231
Propiconazolo	60207-90-1	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	341	X	X	X	173	175	259	261
Propizamide	23950-58-5	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ NO	255	X	X	X	173	175	255	257
Quinalfos	13593-03-8	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS	298	X	X	X	146	157	156	298
Secbumeton	26259-45-0	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O	225	X	O	X	196	169	225	210
Simazina	122-34-9	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201	X	X	X	201	203	186	188
Terbufos	13071-79-9	C ₉ H ₂₁ O ₂ PS ₃	288	X	X	X	231	153	288	186
Terbumeton	33693-04-8	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ O	225	X	O	X	169	210	154	225
Terbutilazina	5915-41-3	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	229	X	X	X	214	216	173	175
Terbutilazina	Desetil	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201	X	O	X	186	188	201	
Terbutrina	886-50-0	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	241	X	O	X	185	226	170	241
Tetraclorvinfos	22248-79-9	C ₁₀ H ₉ Cl ₄ O ₄ P	364	X	X	X	329	331	333	109
Tetradifon	116-29-0	C ₁₂ H ₆ Cl ₄ O ₂ S	354	O	X	X	354	356	159	161
Tiocarbazil	36756-79-3	C ₁₆ H ₂₅ NOS	279	X	O	X	91	100	156	279
Tolclofos Metile	57018-04-9	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ O ₃ PS	300	X	X	X	265	267	125	93
Triadimefon	43121-43-3	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	293	X	X	X	57	208	210	128
Triadimenol	55219-65-3	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂	295	X	X	X	112	168	128	130
Triazofos	24017-47-8	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	313	X	O	X	161	162	172	257
Trifluralin	1582-09-8	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	335	X	X	X	306	264	307	206
Vinclozolin	50471-44-8	C ₁₂ H ₉ Cl ₂ NO ₃	285	X	X	X	212	214	285	287

PM: peso molecolare
O: non rilevato
X: rilevato
Ioni MS: masse di ioni caratteristici (m/z) per l'analisi in GC-MS SIM

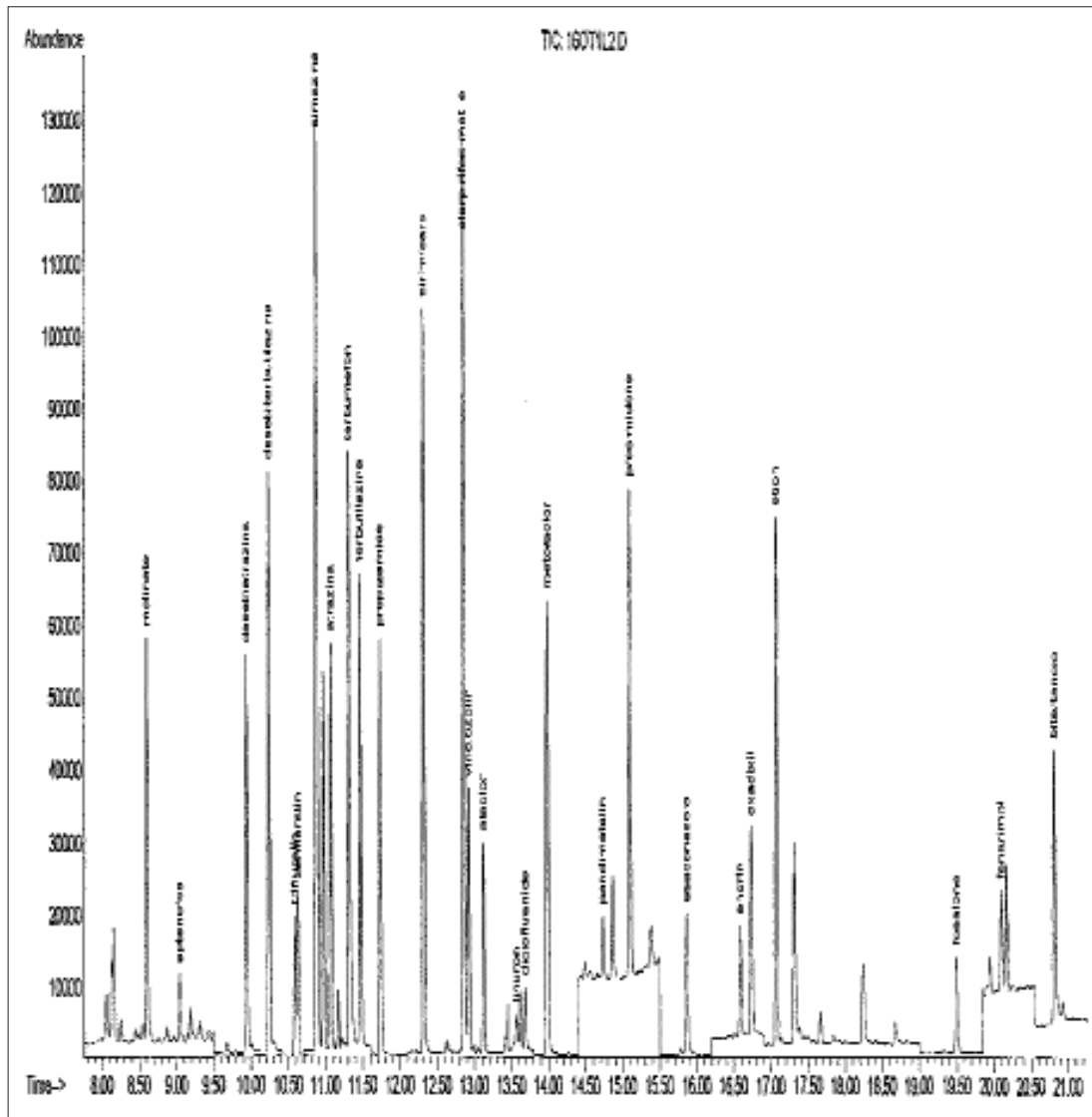


Figura 7: Cromatogramma CG/MS-SIM di un'estratto di acqua addizionata di prodotti fitosanitari (SPE C18; 500 mL a 0,5 mL) su colonna HP1-MS (l=30 m, d.i.=0,25 mm, spessore film=0,25 µm). Condizioni operative: 50°C per 1,1 min; 50→120°, 30°C/min; 120→285°, 8,4°C/min; 285°C per 4 min - "splitless" 1 minuto.

COSTITUENTI ORGANICI

Tabella 8: Concentrazioni determinate e relativi ioni

Sostanza attiva	concentrazione (µg/l)	ioni acquisiti
molinate	0,11	126-55-187
eptenofos	0,12	124-126-89
desetilatrazina	0,17	172-174-187
desetilterbutilazina	0,17	186-188-201
trifluralin	0,12	306-264-335
benfluralin	0,12	292-264-293
simazina	0,16	201-203-186
atrazina	0,13	200-202-215
terbumeton	0,17	210-169-225
terbutilazina	0,12	214-216-229
propizamide	0,13	173-175-255
pirimicarb	0,14	166-72-238
clorpirifos metile	0,18	286-288-125
vinclozolin	0,15	212-214-285
alaclor	0,14	160-188-238
linuron	0,12	61-248-250
diclofluanide	0,14	123-224-226
metolaclor	0,16	162-238-240
pendimetalin	0,10	252-281-220
procimidone	0,14	283-285-96
esaconazolo	0,15	214-216-231
endrin	0,18	261-263-265
etion	riferimento interno	231-97-153
oxadixil	0,14	163-132-105
fosalone	0,12	182-184-367
fenarimol	0,11	139-141-251
bitertanolo	0,13	170-168-171

5070. Fenoli

I composti fenolici, per la loro diffusione, sono inquinanti di rilevante interesse ambientale, risultato di diverse attività industriali, agricole e dei processi di disinfezione con cloro di acque potabili e di scarico.

Composti fenolici sono presenti negli scarichi delle industrie della plastica, dei coloranti e delle cartiere. I cloro ed i nitro-fenoli sono i maggiori prodotti di degradazione degli erbicidi appartenenti alla classe dei fenossiacidi clorurati e degli organofosforati. Inoltre i fenoli possono derivare dalla biodegradazione di prodotti naturali quali gli acidi umici e la lignina.

In particolare, i clorofenoli sono pericolosi per la salute umana anche quando sono presenti nelle acque a basse concentrazioni.

Vengono descritti nel seguito due metodi, uno spettrofotometrico basato sulla reazione, preceduta, o meno, da estrazione con cloroformio, del gruppo idrossilico con 4-amminoantipirina (Metodi A1 e A2, rispettivamente), l'altro che impiega la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).

Il metodo spettrofotometrico soffre di notevoli limitazioni:

- non è adatto, per la sua scarsa sensibilità, alla determinazione di fenoli in tracce;
- come tutti i metodi aspecifici, è scarsamente accurato e tende generalmente a sovrastimare il contenuto di fenoli nel campione;
- non è in grado di distinguere fenoli con diversa tossicità e quindi risulta inadatto a valutare l'impatto di questi composti sull'ambiente.

Può essere impiegato, tuttavia, in valutazioni preliminari ("screening") sul contenuto di fenoli in un campione o per caratterizzare effluenti a composizione chimica nota.

Nonostante queste limitazioni, il metodo alla 4-amminoantipirina, tradizionalmente molto conosciuto, è inserito in numerosi protocolli per l'analisi dei fenoli, utilizzati in Italia e all'estero ed è indicato come metodo di riferimento in alcune normative nazionali (All. 2 del D.Lgs. 152/99, Sez. A, riguardante i criteri di classificazione delle acque superficiali destinate alla produzione di acqua potabile e Sez. B, criteri di classificazione delle acque idonee alla vita dei pesci).

Per questi motivi si è ritenuto opportuno mantenere detto metodo affiancando ad esso un metodo cromatografico (Metodo B) che consente di superare le limitazioni precedentemente indicate e di determinare singoli fenoli a livelli di tracce ($\mu\text{g/L}$).

METODI A – Determinazione spettrofotometrica

I metodi A1 e A2 consentono la determinazione dei fenoli distillabili (fenolo, fenoli orto e meta-sostituiti e alcuni para-sostituiti nei quali il sostituito può essere un carbossile, un alogeno, un metossile o un gruppo solfonico) che reagiscono con la 4-amminoantipirina.

I fenoli che presentano come sostituito in para un alchile, un arile, un gruppo benzoilico, un nitro gruppo, un gruppo nitroso, o un gruppo aldeidico, non vengono determinati con il presente metodo. Un tipico esempio di composto, appartenente a questa seconda categoria, è il para-cresolo (4-metilfenolo) che può essere presente in acque di scarico industriali.

METODO A1 - Determinazione spettrofotometrica mediante 4-amminoantipirina previa estrazione con cloroformio**1. Principio del metodo**

I fenoli (fenolo, cresoli, xilenoli e relativi omologhi e derivati separabili mediante distillazione in ambiente acido) nelle acque naturali e di scarico vengono determinati mediante un metodo spettrofotometrico basato sulla formazione nella soluzione acquosa, a $\text{pH}=10\pm 0,2$, di un composto colorato in giallo per reazione con la 4-amminoantipirina in presenza di esacianoferrato (III). Il composto viene estratto con cloroformio e l'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda di 460 nm. La sensibilità del metodo e l'intensità del colore del composto colorato non sono le stesse per composti fenolici diversi. La concentrazione di composti fenolici nel campione viene espressa come mg/L di fenolo ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$).

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione 0,005-0,1 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore**3.1 Sostanze chimiche ossidanti**

Il cloro o altri ossidanti, rivelabili per aggiunta di ioduro di potassio, acidificazione e conseguente liberazione di iodio, possono essere distrutti aggiungendo una soluzione di solfato di ferro (II) o di arsenito di sodio. L'eventuale eccesso di questi reattivi non interferisce nel dosaggio dei fenoli in quanto il campione viene successivamente sottoposto a distillazione. La rimozione delle sostanze ossidanti deve avvenire immediatamente dopo il campionamento, altrimenti si corre il rischio che i composti fenolici, ossidati rapidamente, in parte o totalmente, vengano determinati in difetto.

3.2 Oli e catrami

Molti composti di natura fenolica possono essere sottratti alla determinazione in quanto si sciolgono in oli e catrami, che, se presenti, vanno eliminati mediante estrazione selettiva con tetracloruro di carbonio in ambiente fortemente basico. In queste condizioni non vengono estratti i fenoli.

In pratica si porta il pH dell'acqua in esame a $12,0\div 12,5$ mediante aggiunta di idrossido di sodio in pastiglie e si effettua l'estrazione; successivamente si elimina ogni traccia di tetracloruro di carbonio mediante leggero riscaldamento su bagno termostatico.

3.3 Composti solforati

I composti che per acidificazione liberano idrogeno solforato (H_2S) o biossido di zolfo (SO_2) possono interferire nella determinazione dei fenoli; per eliminare queste interferenze, si acidifica il campione con acido fosforico fino a viraggio del metilarancio, quindi si aggiunge una quantità di solfato di rame (CuSO_4) sufficiente ad impartire un leggero colore blu al campione o finché non si osservi più formazione di precipitato (CuS). L'eccesso di H_2S o SO_2 può essere rimosso aerando il campione per 5-10 minuti sotto agitazione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Per il campionamento e la conservazione del campione bisogna operare secondo quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Poiché i composti fenolici in acqua possono essere facilmente ossidati, occorre procedere rapidamente all'analisi del campione. Le interferenze, dovute alla biodegradazione operata da specifici batteri presenti nelle acque, che possono tradursi in diminuzione della quantità dei fenoli da determinare, possono essere contenute conservando il campione a temperatura intorno a 4°C od eliminate per cauta acidificazione del campione con acido solforico concentrato fino a pH<2.

5. Apparecchiature

Attrezzatura di uso comune di laboratorio.

5.1 *Apparecchio di distillazione in vetro*, con giunti smerigliati, costituito da un pallone da distillazione a collo lungo avente capacità di 1 L, collegato ad un refrigerante e matraccio di raccolta del distillato.

5.2 *Spettrofotometro* dotato di celle con cammino ottico da 1-10 cm.

6. Reattivi

6.1 *Soluzione di 4-amminoantipirina al 2%*

Sciogliere 2,0 g di 4-amminoantipirina in acqua distillata e diluire a 100 mL. Questa soluzione va preparata giornalmente.

6.2 *Soluzione di cloruro di ammonio al 2%*

Sciogliere 20 g di cloruro di ammonio (NH₄Cl) in acqua distillata e diluire a 1000 mL.

6.3 *Soluzione concentrata di ammoniaca (d=0,90)*

6.4 *Cloroformio*

6.5 *Diclorometano*

6.6 *Soluzione di metilarancio allo 0,1 %*

Sciogliere 0,1 g di metilarancio in 100 mL di acqua distillata.

6.7 *Acido solforico concentrato (96%) (d=1,84)*

6.8 *Acido solforico diluito 1 + 1*

Aggiungere cautamente 100 mL di acido solforico concentrato (6.7) a 100 mL di acqua sotto continua agitazione. Raffreddare a temperatura ambiente prima dell'uso.

6.9 *Acido fosforico concentrato (85%)*

6.10 *Soluzione di acido fosforico (1+9)*

Miscelare 10 mL di acido fosforico (6.9) con 90 mL di acqua distillata.

6.11 *Idrossido di sodio in pasticche*

6.12 *Soluzione di idrossido di sodio al 10%*

Sciogliere 10 g di idrossido di sodio (6.11) in acqua distillata e diluire a 100 mL.

6.13 *Cloruro di sodio*

6.14 *Soluzione di esacianoferrato (III) di potassio all'8%*

Sciogliere 8 g di esacianoferrato (III) di potassio ($K_3Fe(CN)_6$) in acqua distillata e diluire a 100 mL. Se necessario, filtrare e conservare in bottiglia di vetro scura. Questa soluzione è stabile per una settimana.

6.15 *Soluzione di solfato di rame (100 g/L)*

Sciogliere 100 g di solfato di rame $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ in acqua distillata e diluire a 1000 mL.

6.16 *Soluzione concentrata di fenolo (1000 mg/L) (1 mL=1 mg)*

Sciogliere 100 mg di fenolo (C_6H_5OH) puro in acqua distillata precedentemente bollita e raffreddata e portare a 100 mL con la stessa acqua. La soluzione si può usare per un mese.

6.17 *Soluzione diluita di fenolo (10 mg/L) (1 mL=0,01 mg)*

Introdurre 2,5 mL di soluzione concentrata in un matraccio tarato da 250 mL e portare a volume con acqua distillata trattata come in (6.16). Questa soluzione va preparata giornalmente.

6.18 *Solfato di sodio anidro*

7. Procedimento

Se necessario, effettuare preliminarmente i trattamenti previsti per l'eliminazione delle sostanze interferenti descritti al Capitolo 3.

Prelevare poi 500 mL di campione. Portare la soluzione a pH=4 circa con acido fosforico diluito (6.10) usando come indicatore il metilarancio (6.6) oppure un pHmetro. Se il campione è stato conservato con aggiunta di acido solforico come indicato al Capitolo 4, omettere l'aggiunta di acido fosforico e portare la soluzione a pH=4 circa con idrossido di sodio al 10% (6.12). Aggiungere 5 mL della soluzione di solfato di rame (6.15).

7.1 *Distillazione*

Trasferire la soluzione nel pallone di distillazione (5.1) e distillare fino a raccogliere circa 450 mL di distillato in pallone tarato da 500 mL.

Interrompere la distillazione e, quando cessa l'ebollizione, aggiungere altri 50 mL di acqua distillata calda nel pallone di distillazione (5.1). Riprendere la distillazione fino a raccogliere un volume di 500 mL.

Qualora il distillato fosse torbido, sottoporlo a nuova distillazione, operando con le stesse modalità di prima; nel caso in cui il distillato risultasse ancora torbido è necessario ricorrere al procedimento descritto al punto successivo.

7.2 *Trattamento di distillati torbidi*

A 500 mL del campione originale aggiungere 4 gocce di indicatore metilarancio (6.6) e una quantità di acido solforico (6.8) fino al viraggio; trasferire la soluzione in un imbuto separato-

re ed aggiungere 150 g di cloruro di sodio (6.13). Estrarre con cinque successive porzioni di cloroformio (6.4), impiegando la prima volta 40 mL di solvente e 25 mL le altre successive. Trasferire l'estratto cloroformico in un secondo imbuto separatore ed agitare con tre successive aggiunte di soluzione di idrossido di sodio (6.12), impiegando un volume di 4 mL per la prima volta e 3 mL per le due successive. Riunire gli estratti alcalini in un beaker, riscaldare su un bagno ad acqua fino a rimozione completa del cloroformio, quindi raffreddare e diluire a 500 mL con acqua distillata. Procedere con la distillazione come descritto in (7.1).

Nota: si può usare il diclorometano (6.5) al posto del cloroformio, specialmente se si forma un'emulsione stabile durante l'estrazione della soluzione cloroformica con idrossido di sodio.

7.3 Taratura

Prendere 5 beaker da 1000 mL ed in ognuno di essi versare 500 mL di acqua distillata. Uno di questi fungerà da bianco mentre negli altri quattro aggiungere, con pipetta tarata, rispettivamente, 0,5 mL, 1,0 mL, 2,0 mL e 5,0 mL di soluzione di riferimento di fenolo (6.17) ed agitare.

Aggiungere 25 mL di soluzione di cloruro di ammonio (6.2) e portare le soluzioni a $\text{pH} = 10,0 \pm 0,2$ con la soluzione di ammoniaca (6.3).

Trasferire ciascuna soluzione in un imbuto separatore da 1000 mL ed aggiungere 3 mL di soluzione di 4-amminoantipirina (6.1) agitando immediatamente.

Aggiungere a ciascuna soluzione 3 mL di soluzione di esacianoferrato (III) di potassio (6.14) agitando immediatamente ed attendere 5 minuti per lo sviluppo del colore. Le soluzioni dovrebbero essere chiare, leggermente colorate in giallo. In caso contrario, sono presenti sostanze interferenti che vanno rimosse.

Ad ogni imbuto separatore aggiungere esattamente 25 mL di cloroformio (6.4) ed agitare per alcuni minuti.

Attendere la separazione delle fasi e filtrare la fase organica attraverso uno strato di solfato di sodio anidro (6.18) posto su lana di vetro, raccogliendola direttamente nelle celle di misura.

Effettuare le letture spettrofotometriche alla lunghezza d'onda di 460 nm, usando celle da 1-5 cm e azzerando lo strumento con il bianco. Qualora si utilizzino celle da 10 cm dovranno essere impiegati aliquote di 50 mL di cloroformio per l'estrazione. Costruire la curva di taratura riportando in ascisse le concentrazioni di fenolo espresse in mg/L e in ordinate i valori di assorbanza delle soluzioni corrispondenti.

7.4 Determinazione preliminare dei composti fenolici

Trasferire 500 mL di distillato in un beaker da 1 L ed operare come descritto per la costruzione della curva di taratura (7.3).

7.5 Determinazione dei composti fenolici

Operare come descritto in (7.3) per le soluzioni di riferimento. Se la determinazione preliminare (7.4) ha fornito un valore compreso nella curva di taratura questo può essere utilizzato direttamente senza effettuare ulteriori misure.

Se invece la determinazione preliminare (7.4) ha indicato una concentrazione di fenoli superiore a 0,1 mg/L si può seguire il metodo A2 (determinazione spettrofotometrica diretta con 4-amminoantipirina).

8. Calcoli

La concentrazione dei fenoli nel campione, espressa come milligrammi/litro di fenolo, è data da:

$$C = \frac{a \cdot V_1}{V_2}$$

dove:

C = concentrazione (mg/L) di fenoli;

a = concentrazione (mg/L) di fenoli ricavata dalla curva di taratura;

V₁ = volume (mL) utilizzato per la curva di taratura;

V₂ = volume (mL) utilizzato per la determinazione.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da sei laboratori su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata aventi una concentrazione in fenoli di 0,09 mg/L hanno fornito un coefficiente di variazione [CV(%) = (scarto tipo/valore medio)·100] del 5%.

L'accuratezza del metodo dipende, oltre che dalle sostanze interferenti, dai coefficienti di estinzione dei fenoli presenti.

METODO A2 - Determinazione spettrofotometrica diretta mediante 4-amminoantipirina

1. Principio del metodo

I fenoli (fenolo, cresoli, xilenoli e relativi omologhi e derivati separabili mediante distillazione in ambiente acido) nelle acque naturali e di scarico vengono determinati mediante un metodo spettrofotometrico basato sulla formazione nella soluzione acquosa, a pH=10±0,2, di un composto colorato in giallo per reazione con la 4-amminoantipirina in presenza di esacianoferrato (III). L'assorbanza del composto viene misurata alla lunghezza d'onda di 510 nm. La sensibilità del metodo e l'intensità del colore del composto colorato non sono le stesse per composti fenolici diversi. La concentrazione di composti fenolici nel campione viene espressa come mg/L di fenolo (C₆H₅OH).

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione 0,1-5 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

3.1 Sostanze chimiche ossidanti

Il cloro o altri ossidanti, rivelabili per aggiunta di ioduro di potassio, acidificazione e conseguente liberazione di iodio, possono essere distrutti aggiungendo una soluzione di solfato di ferro (II) o di arsenito di sodio. L'eventuale eccesso di questi reattivi non interferisce nel dosaggio dei fenoli in quanto il campione viene successivamente sottoposto a distillazione. La rimozione delle sostanze ossidanti deve avvenire immediatamente dopo il campionamento, altrimenti si corre il rischio che i composti fenolici, ossidati rapidamente, in parte o totalmente, vengano determinati in difetto.

3.2 Oli e catrami

Molti composti di natura fenolica possono essere sottratti alla determinazione in quanto si sciolgono in oli e catrami, che, se presenti, vanno eliminati mediante estrazione selettiva con

tetracloruro di carbonio in ambiente fortemente basico. In queste condizioni non vengono estratti i fenoli.

In pratica si porta il pH dell'acqua in esame a $12,0 \div 12,5$ mediante aggiunta di idrossido di sodio in pasticche e si effettua l'estrazione; successivamente si elimina ogni traccia di tetracloruro di carbonio mediante leggero riscaldamento su bagno termostatico.

3.3 *Composti solforati*

I composti che per acidificazione liberano idrogeno solforato (H_2S) o biossido di zolfo (SO_2) possono interferire nella determinazione dei fenoli; per eliminare queste interferenze, si acidifica il campione con acido fosforico fino a viraggio del metilarancio, quindi si aggiunge una quantità di solfato di rame ($CuSO_4$) sufficiente ad impartire un leggero colore blu al campione o finché non si osservi più formazione di precipitato (CuS). L'eccesso di H_2S o SO_2 può essere rimosso aerando il campione per 5-10 minuti sotto agitazione.

4. **Campionamento e conservazione del campione**

Per il campionamento e la conservazione del campione bisogna operare secondo quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Poiché i composti fenolici in acqua possono essere facilmente ossidati, occorre procedere rapidamente all'analisi del campione. Le interferenze, dovute alla biodegradazione operata da specifici batteri presenti nelle acque, che possono tradursi in diminuzione della quantità dei fenoli da determinare, possono essere contenute conservando il campione a temperatura intorno a $4^\circ C$ od eliminate per cauta acidificazione del campione con acido solforico concentrato fino a $pH < 2$.

5. **Apparecchiature**

Attrezzatura di uso comune di laboratorio.

5.1 *Apparecchio di distillazione in vetro*, con giunti smerigliati, costituito da un pallone da distillazione a collo lungo avente capacità di 1 L, collegato ad un refrigerante e matraccio di raccolta del distillato.

5.2 *Spettrofotometro* dotato di celle con cammino ottico da 1 cm.

6. **Reattivi**

6.1 *Soluzione di 4-amminoantipirina al 2%*

Sciogliere 2,0 g di 4-amminoantipirina in acqua distillata e diluire a 100 mL. Questa soluzione va preparata giornalmente.

6.2 *Soluzione di cloruro di ammonio al 2%*

Sciogliere 20 g di cloruro di ammonio (NH_4Cl) in acqua distillata e diluire a 1000 mL.

6.3 *Soluzione concentrata di ammoniaca ($d=0,90$)*

6.4 *Cloroformio*

6.5 *Diclorometano*

6.6 *Soluzione di metilarancio allo 0,1%*

Sciogliere 0,1 g di metilarancio in 100 mL di acqua distillata.

6.7 *Acido solforico concentrato (96%) ($d=1,84$)*

6.8 *Acido solforico diluito 1+1*

Aggiungere cautamente 100 mL di acido solforico concentrato (6.7) a 100 mL di acqua sotto continua agitazione. Raffreddare a temperatura ambiente prima dell'uso.

6.9 *Acido fosforico concentrato (85%)*

6.10 *Soluzione di acido fosforico (1+9)*

Miscelare 10 mL di acido fosforico (6.9) con 90 mL di acqua distillata.

6.11 *Idrossido di sodio in pasticche*

6.12 *Soluzione di idrossido di sodio al 10%*

Sciogliere 10 g di idrossido di sodio (6.11) in acqua distillata e diluire a 100 mL.

6.13 *Cloruro di sodio*

6.14 *Soluzione di esacianoferrato (III) di potassio all '8%*

Sciogliere 8 g di esacianoferrato (III) di potassio ($K_3Fe(CN)_6$) in acqua distillata e diluire a 100 mL. Se necessario, filtrare e conservare in bottiglia di vetro scura. Questa soluzione è stabile per una settimana.

6.15 *Soluzione di solfato di rame (100 g/L)*

Sciogliere 100 g di solfato di rame $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ in acqua distillata e diluire a 1000 mL.

6.16 *Soluzione concentrata di fenolo (1000 mg/L) (1 mL=1 mg)*

Sciogliere 100 mg di fenolo (C_6H_5OH) puro in acqua distillata precedentemente bollita e raffreddata e portare a 100 mL con la stessa acqua. La soluzione si può usare per un mese.

6.17 *Soluzione diluita di fenolo (10 mg/L) (1 mL=0,01 mg)*

Introdurre 2,5 mL di soluzione concentrata in un matraccio tarato da 250 mL e portare a volume con acqua distillata trattata come in (6.16). Questa soluzione va preparata giornalmente.

6.18 *Solfato di sodio anidro*

7. Procedimento

Se necessario, effettuare preliminarmente i trattamenti previsti per l'eliminazione delle sostanze interferenti descritti al Capitolo 3.

Prelevare poi 500 mL di campione. Portare la soluzione a pH=4 circa con acido fosforico diluito (6.10) usando come indicatore il metilarancio (6.6) oppure un pHmetro. Se il campione è stato conservato con aggiunta di acido solforico come indicato al Capitolo 4, omettere l'ag-

giunta di acido fosforico e portare la soluzione a pH=4 circa con idrossido di sodio al 10% (6.12). Aggiungere 5 mL della soluzione di solfato di rame (6.15).

7.1 *Distillazione*

Trasferire la soluzione nel pallone di distillazione (5.1) e distillare fino a raccogliere circa 450 mL di distillato in pallone tarato da 500 mL.

Interrompere la distillazione e, quando cessa l'ebollizione, aggiungere altri 50 mL di acqua distillata calda nel pallone di distillazione (5.1). Riprendere la distillazione fino a raccogliere un volume di 500 mL.

Qualora il distillato fosse torbido, sottoporlo a nuova distillazione, operando con le stesse modalità di prima; nel caso in cui il distillato risultasse ancora torbido è necessario ricorrere al procedimento descritto al punto successivo.

7.2 *Trattamento di distillati torbidi*

A 500 mL del campione originale aggiungere 4 gocce di indicatore metilarancio (6.6) e una quantità di acido solforico (6.8) fino al viraggio; trasferire la soluzione in un imbuto separatore ed aggiungere 150 g di cloruro di sodio (6.13). Estrarre con cinque successive porzioni di cloroformio (6.4), impiegando la prima volta 40 mL di solvente e 25 mL le altre successive.

Trasferire l'estratto cloroformico in un secondo imbuto separatore ed agitare con tre successive aggiunte di soluzione di idrossido di sodio (6.12), impiegando un volume di 4 mL per la prima volta e 3 mL per le due successive.

Riunire gli estratti alcalini in un beaker, riscaldare su un bagno ad acqua fino a rimozione completa del cloroformio, quindi raffreddare e diluire a 500 mL con acqua distillata.

Procedere con la distillazione come descritto in 7.1.

NOTA: si può usare il diclorometano (6.5) al posto del cloroformio, specialmente se si forma un'emulsione stabile durante l'estrazione della soluzione cloroformica con idrossido di sodio.

7.3 *Curva di taratura*

Introdurre con pipetta tarata rispettivamente, 1 mL, 5 mL, 10 mL e 50 mL di soluzione di riferimento di fenolo (6.17) in matracci tarati da 100 mL e diluire con acqua distillata a circa 75 mL. In un altro matraccio tarato da 100 mL, che fungerà da bianco, porre 75 mL di acqua distillata.

Aggiungere in ciascun matraccio tarato 5 mL di soluzione di cloruro d'ammonio (6.2) e portare la soluzione a pH (10,0±0,2) con soluzione di ammoniaca (6.3).

Aggiungere 2 mL della soluzione di 4-amminoantipirina (6.1) a ciascuna soluzione e agitare. Aggiungere 2 mL di soluzione di esacianoferrato (III) di potassio (6.14), agitare immediatamente e portare a volume a 100 mL con acqua distillata.

Dopo 15 minuti effettuare le letture allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 510 nm usando celle da 1 cm e azzerando ogni volta lo strumento con il bianco.

Costruire la curva di taratura riportando le letture ottenute su un grafico avente in ascisse le concentrazioni di fenolo espresse in mg/L e in ordinate i valori di assorbanza delle soluzioni corrispondenti.

7.4 *Determinazione preliminare dei composti fenolici*

Trasferire in un beaker 100 mL di distillato ed operare come descritto per la costruzione della curva di taratura (7.3).

7.5 *Determinazione dei composti fenolici*

Operare come descritto in (7.3) per le soluzioni di taratura. Se la determinazione prelimina-

re (7.4) ha fornito un valore compreso nella curva di taratura questo può essere utilizzato direttamente senza effettuare ulteriori misure.

Se invece la determinazione preliminare (7.4) ha indicato una concentrazione di fenoli superiore a 5 mg/L occorre stabilire il volume di distillato (7.1) da impiegare per la determinazione. Per conoscere detto volume effettuare diluizioni successive della soluzione acquosa fino a che la lettura rientri nell'intervallo della curva di taratura. Una volta trovato il rapporto di diluizione ottimale risalire al volume di distillato da impiegare nell'analisi e procedere all'esecuzione del metodo operando come descritto in (7.3).

8. Calcoli

La concentrazione dei fenoli nel campione, espressa come milligrammi/litro di fenolo, è data da:

$$C = \frac{a \cdot V_1}{V_2}$$

dove:

C = concentrazione (mg/L) di fenoli;

a = concentrazione (mg/L) di fenoli ricavata dalla curva di taratura;

V₁ = volume (mL) utilizzato per la curva di taratura;

V₂ = volume (mL) utilizzato per la determinazione.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da sei laboratori su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata aventi una concentrazione in fenoli di 4,7 mg/L hanno fornito un coefficiente di variazione [CV(%) = (scarto tipo/valore medio)·100] del 3,8%. Va tenuto presente che la precisione di un metodo generalmente peggiora all'aumentare della complessità della matrice.

L'accuratezza del metodo dipende, oltre che dalle sostanze interferenti, dai coefficienti di estinzione dei fenoli presenti.

METODO B – Determinazione mediante cromatografia liquida ad alta prestazione con rivelazione spettrofotometrica nell'ultravioletto (HPLC-UV)

1. Principio del metodo

Il metodo consiste in una estrazione liquido-liquido o liquido-solido, su cartucce SPE (solid phase extraction), dei fenoli contenuti nel campione acquoso. I fenoli contenuti nell'estratto organico concentrato vengono separati e rilevati mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata ad una rivelazione spettrofotometrica nell'ultravioletto (UV).

L'analisi qualitativa dei singoli fenoli è basata sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi ottenuti nel cromatogramma HPLC-UV del campione con quelli ottenuti da idonee soluzioni di riferimento. La determinazione quantitativa dei vari fenoli viene effettuata con le aree dei rispettivi picchi cromatografici sulla base di opportune rette di taratura di soluzioni di riferimento. Per una migliore accuratezza del metodo si può utilizzare come riferimento interno, aggiunto nel campione acquoso, il 4-fluorofenolo. I risultati sono di norma espressi in µg/L per ciascun fenolo.

Tabella 1: Fenoli analizzabili con il presente metodo

Composto	
1	Fenolo
2	4-nitrofenolo
3	2-clorofenolo
4	2,4-dinitrofenolo
5	2-nitrofenolo
6	2,4-dimetilfenolo
7	4-cloro-3-metilfenolo
8	2,4-diclorofenolo
9	4,6-dinitro-2-metilfenolo
10	2,4,6-triclorofenolo
11	pentaclorofenolo

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque superficiali, sotterranee e di scarico e consente la determinazione dei fenoli riportati in Tab. 1.

Per le acque superficiali, partendo da un campione di 1000 mL, il metodo consente di determinare ciascun analita ad una concentrazione di almeno 1 µg/L. Per le acque di scarico, partendo da un campione di 50 mL, il metodo consente di dosare gli analiti ad una concentrazione di 50 µg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Normali interferenti possono essere quei composti organici che danno luogo, durante l'analisi cromatografica, a picchi con tempi di ritenzione coincidenti a quelli dei fenoli in esame. Solventi, reagenti, vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro ed ogni trattamento del campione possono causare la presenza di picchi interferenti e/o alterazioni della corrente di fondo del rivelatore con conseguenti difficoltà d'interpretazione del tracciato cromatografico. Pertanto, al fine di essere sicuri che tutti i materiali utilizzati siano esenti da interferenze nelle condizioni operative adottate, è buona norma, sia all'inizio dell'indagine che periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi" sostituendo al campione acqua distillata. Nel caso di evidenza d'interferenze, individuarne la provenienza analizzando ogni singolo passaggio della procedura e procedere alla loro eliminazione. Può essere richiesta una specifica selezione dei reattivi ed una purificazione dei solventi mediante distillazione. Oli e catrami, se presenti, vanno eliminati mediante estrazione selettiva con un solvente organico (tetracloruro di carbonio, esano, ecc.) in ambiente fortemente basico. In queste condizioni non vengono estratti i fenoli. Portare il pH dell'acqua in esame a 12,0÷12,5 mediante aggiunta di idrossido di sodio in pastiglie ed effettuare l'estrazione; successivamente eliminare ogni traccia di tetracloruro di carbonio mediante leggero riscaldamento su bagno maria.

4. Campionamento e conservazione del campione

I campioni vengono prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, con chiusura a smeriglio oppure a vite con guarnizione di teflon. Poiché i composti fenolici in acqua possono essere facilmente ossidati, occorre procedere rapidamente all'analisi del campione, preferibilmente entro 48 ore dal prelievo. Le interferenze, dovute alla biodegradazione operata da specifici batteri presenti nelle acque, che possono tradursi in una diminuzione della quantità dei fenoli da determinare, possono essere limitate conservando il campione a temperatura intorno a 4°C od eliminate per cauta acidificazione del campione con acido solforico concentrato fino a pH<2.

5. Apparecchiature

5.1 Normale vetreria di laboratorio

Dopo il lavaggio e prima dell'uso, la vetreria deve essere sciacquata con acqua bidistillata, con acetone ed asciugata in stufa.

5.2 HPLC

Si consiglia l'uso di uno strumento dotato di rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile o a serie di diodi (DAD) e di colonna a fase inversa. La fase mobile è costituita da una miscela di acetonitrile/acqua o metanolo/acqua tamponata a pH=3 mediante acido fosforico o acetico o formico o trifluoroacetico. L'analisi viene effettuata in gradiente la cui composizione e durata, così come il flusso di lavoro, dipende dal tipo e dalle dimensioni della colonna utilizzata.

5.3 Adsorbenti per estrazione SPE

Per l'estrazione liquido-solido si consiglia di utilizzare cartucce costituite da carbone grafitato o da materiale polimerico, con fase stazionaria polare o specifica per composti fenolici o da materiale siliceo con fase stazionaria C₁₈ o C₈. In alternativa si possono utilizzare i dischi SPE. La quantità di materiale adsorbente dipenderà dalle cartucce utilizzate. La procedura di condizionamento, estrazione ed eluizione viene effettuata sotto vuoto montando la cartuccia su una beuta da vuoto o su un sistema per estrazione liquido-solido disponibile in commercio secondo le modalità consigliate dal produttore delle cartucce.

La presenza di particolato nel campione acquoso (acque superficiali, di scarico) può determinare un'ostruzione parziale o totale della cartuccia durante il procedimento di estrazione. Tale inconveniente può essere superato utilizzando filtri in fibra di vetro o polvere di vetro in linea al substrato adsorbente in modo tale da effettuare una preventiva filtrazione del campione o filtrando il campione su filtri in fibra di vetro, lavando il filtro con metanolo ed aggiungendo il metanolo raccolto al campione prima del passaggio sulla cartuccia.

5.4 Evaporatore rotante

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua utilizzata deve essere esente da sostanze organiche.

6.1 Acetonitrile o metanolo (per HPLC)

6.2 Acido fosforico oppure acido acetico oppure acido formico oppure acido trifluoroacetico

6.3 Diclorometano

6.4 Tetrabutylammonio fluoruro (TBAF)

6.5 Carbonato di sodio (Na₂CO₃)

6.6 Soluzioni di riferimento di fenoli

6.6.1 Soluzioni concentrate di fenoli

Le soluzioni concentrate di fenoli si preparano pesando esattamente una quantità di circa 100 mg di ognuno dei fenoli di Tab. 1 e del riferimento interno, trasferendola in un matraccio tarato (100 mL) e portando a volume con acetonitrile. Queste soluzioni possono essere conservate a 4°C per un mese. Sono disponibili in commercio delle soluzioni di riferimento multi-componente di fenoli. Queste soluzioni, essendo vendute con certificato d'analisi, possono essere utilizzate in sostituzione della procedura sopra riportata.

6.6.2 Soluzioni diluite di fenoli

Le soluzioni diluite a concentrazione di circa 0,1-10 mg/L, contenenti il riferimento interno, se

utilizzato, ad una concentrazione compresa tra 1 e 10 mg/L, vengono ottenute per diluizioni successive delle soluzioni concentrate impiegando come solvente la fase mobile usata nell'analisi HPLC. È preferibile che tali soluzioni di riferimento siano preparate giornalmente.

7. Procedimento

7.1 *Trattamento preliminare*

Se il campione è stato refrigerato, prima dell'estrazione farlo riequilibrare a temperatura ambiente. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire una migliore omogeneità. Se si utilizza il riferimento interno, aggiungere un volume idoneo di soluzione in maniera che la sua concentrazione, dopo la procedura di concentrazione, sia la stessa usata per le soluzioni diluite (6.6.2).

7.2 *Estrazione*

7.2.1 Estrazione liquido-liquido

Il campione (1 litro o 50 mL, rispettivamente per acque superficiali o di scarico), portato a pH=2 con acido solforico, viene estratto con due aliquote successive di diclorometano da 50 mL o 10 mL ciascuna, rispettivamente per un campione di acqua superficiale o di scarico. Anidrificare gli estratti riuniti con solfato di sodio anidro e portare a piccolo volume (circa 5 mL) con un rotoevaporatore, avendo cura di utilizzare un vuoto moderato (40-50 mmHg) ed una temperatura del bagno termostato non superiore ai 30°C. Questo stadio è particolarmente critico in quanto è stata evidenziata la perdita dei fenoli più volatili quando è stato usato un vuoto più spinto ed una temperatura più elevata. Portare a secco con un moderato flusso di azoto e riprendere con 0,5 mL della fase mobile di partenza del gradiente cromatografico. Per evitare la perdita dei fenoli più volatili si possono utilizzare alcuni accorgimenti descritti nel Sottoparagrafo 7.2.4. L'estratto ottenuto viene analizzato mediante HPLC-UV. La Fig. 1 mostra una tipica separazione di fenoli con questa procedura.

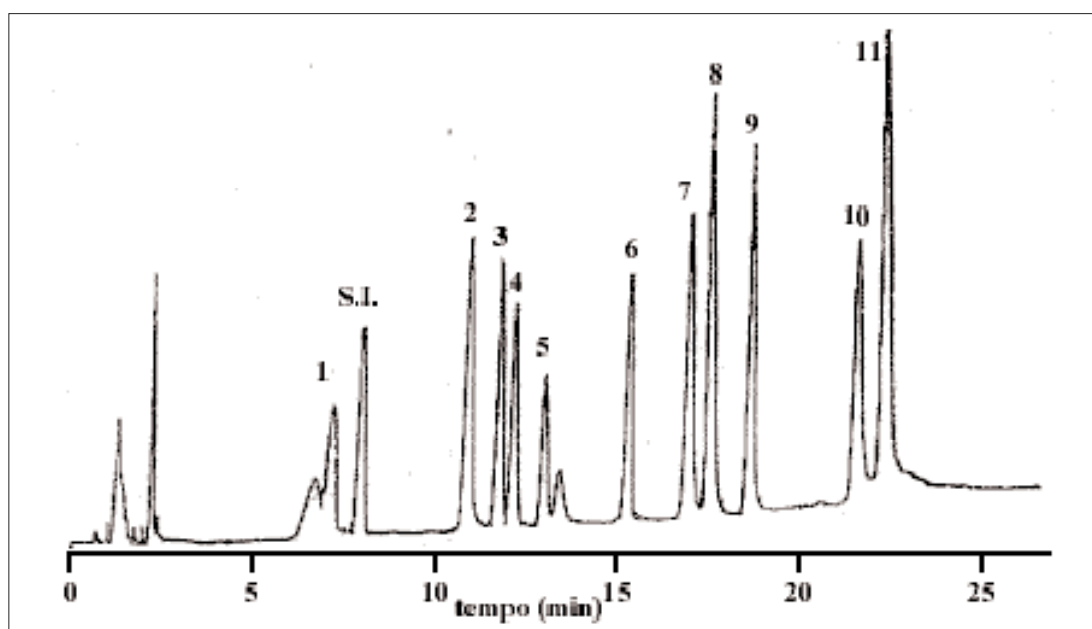


Figura 1: Cromatogramma ottenuto a 220 nm di un campione di acqua superficiale contaminato con 10 ppb di ciascun composto fenolico di Tab. 1, estratto con tecnica liquido/liquido. Condizioni analitiche: colonna cromatografica Supelcosil LC-8 150x4,6 mm, dimensione particelle 5 µm, flusso 1,2 mL/min. Gradiente (acetone/acqua + acido acetico 1%): da 35:65 (inizio gradiente) a 100:0 in 20 min, volume iniettato 10 µL.

7.2.2 Estrazione SPE con cartuccia di carbone grafitato

Condizionare la cartuccia SPE con 6 mL di diclorometano/metanolo 80:20, 2 mL di metanolo e 14 mL di acqua a pH=2. Portare il pH del campione acquoso a 2 con acido solforico. Far passare il campione (1 litro o 50 mL, rispettivamente per acque superficiali o di scarico), attraverso la cartuccia SPE ad un flusso di 60-70 mL/min. Successivamente far passare 7 mL di acqua distillata (per eliminare i sali) per gravità, portare a secco il substrato adsorbente sotto vuoto, lavare con 0,5 mL di metanolo (per eliminare l'acqua residua) avendo cura di farlo passare lentamente regolando opportunamente il vuoto e quindi portare a secco sotto vuoto per un minuto. Invertire la cartuccia introducendo in essa un pistone cilindrico di teflon, avente base conica e una punta di tipo Luer, fino a venire a contatto con il setto superiore della cartuccia stessa. Eluire i fenoli con 6 mL di una miscela diclorometano/metanolo 80:20 (v/v) contenente TBAF 10 mM. Portare a secco con un moderato flusso di azoto e riprendere con 0,5 mL della fase mobile di partenza del gradiente cromatografico. Analizzare l'estratto ottenuto mediante HPLC-UV.

La Fig. 2 mostra una tipica separazione di fenoli con questa procedura.

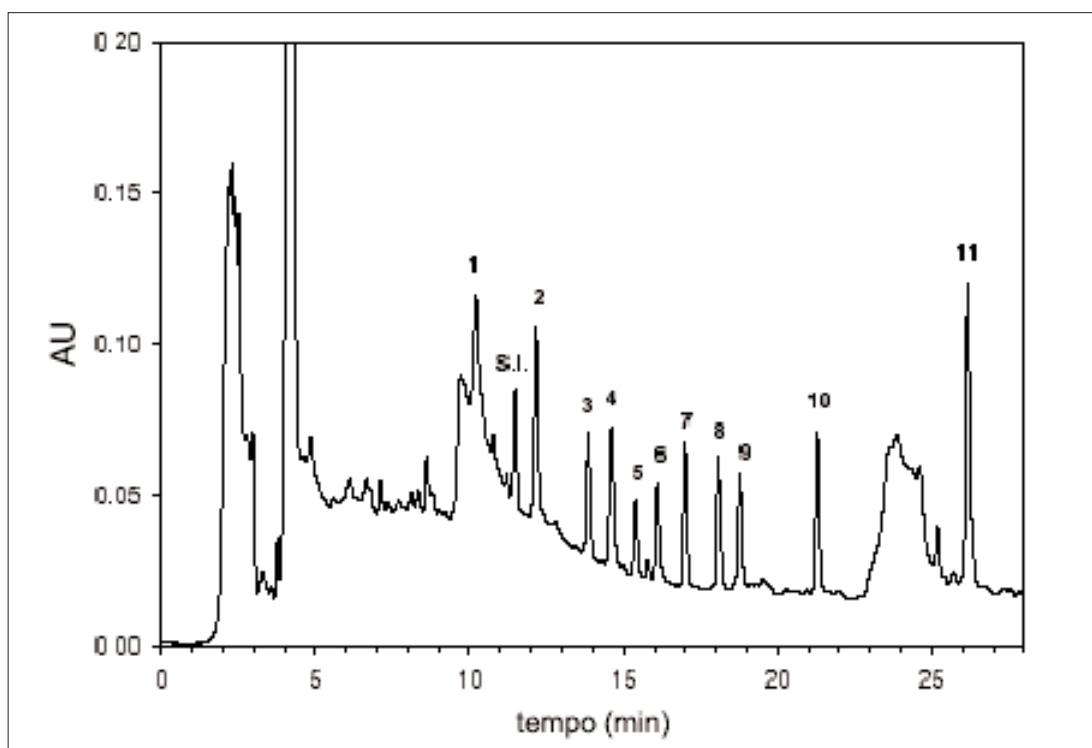


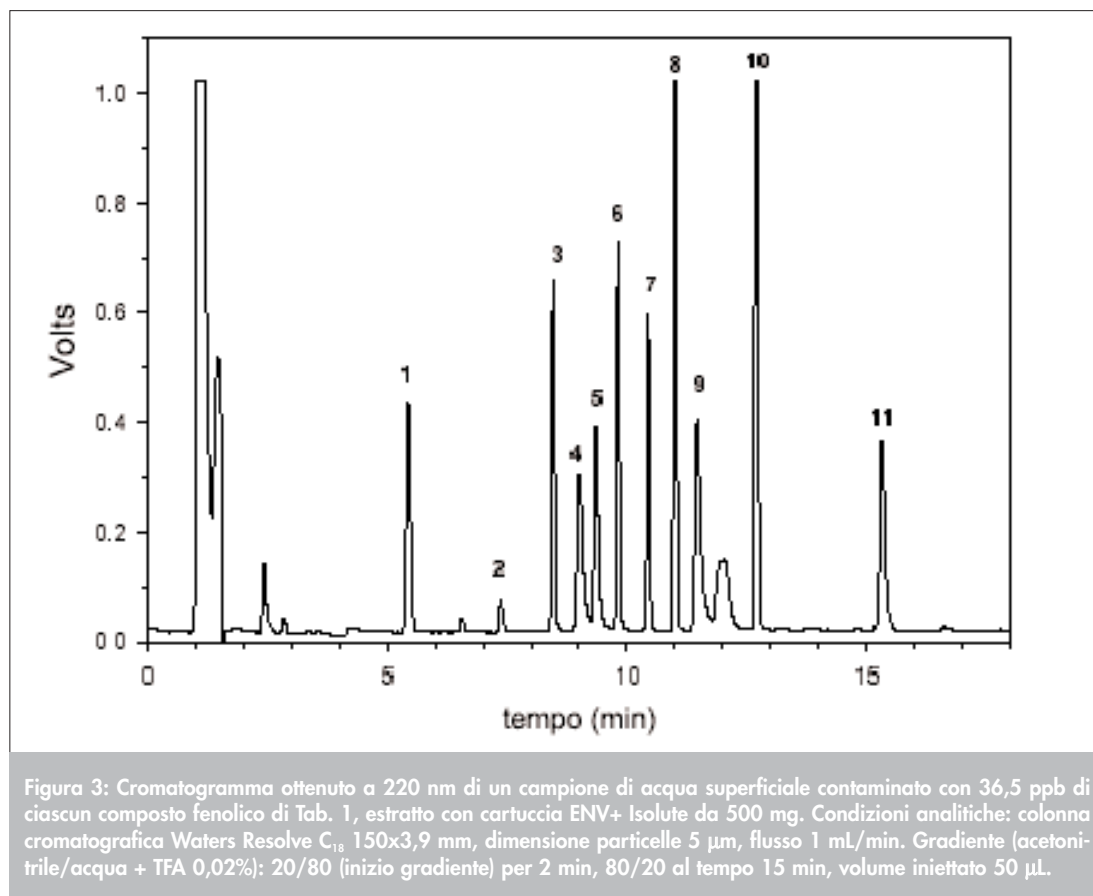
Figura 2: Cromatogramma ottenuto a 220 nm di un campione di acqua di pozzo contaminato con 5 ppb di ciascun composto fenolico di Tab. 1, estratto con cartuccia di carbone grafitato "Carboglyph-4" da 500 mg. Condizioni analitiche: colonna cromatografica Alltech Alltima C18 250x3 mm, dimensione particelle 5 μ m, flusso 0,6 mL/min. Gradiente (acetonitrile + TFA 0,025%/acqua + TFA 0,025%): da 22/78 (inizio gradiente) a 90/10 in 20 min, volume iniettato 10 μ L.

7.2.3 Estrazione SPE con cartuccia di materiale polimerico con fase stazionaria polare o di materiale siliceo con fase stazionaria C₁₈ o C₈

Condizionare la cartuccia SPE secondo quanto suggerito dal produttore della cartuccia. Portare il pH del campione acquoso a 2 con acido solforico.

Far passare il campione (1 litro o 50 mL, rispettivamente per acque superficiali o di scarico), attraverso la cartuccia SPE al flusso suggerito dal produttore della cartuccia. Successivamente far passare 5 mL di acqua distillata (per eliminare i sali) e portare a secco il substrato adsorbente con un flusso di azoto o sotto vuoto. Eluire i fenoli con una miscela il cui volume e la cui composizione sono consigliati dal produttore. Portare a secco con un moderato flusso

di azoto e riprendere con 0,5 mL della fase mobile di partenza del gradiente cromatografico. Per evitare la perdita dei fenoli più volatili si possono utilizzare alcuni accorgimenti descritti nel Sottoparagrafo 7.2.4. L'estratto ottenuto viene analizzato mediante HPLC-UV. La Fig. 3 mostra una tipica separazione di fenoli con questa procedura.



7.2.4 Accorgimenti per evitare la perdita dei fenoli più volatili

La concentrazione del volume dell'estratto risulta essere lo stadio più critico dell'intero procedimento a causa della possibile perdita per evaporazione dei fenoli più volatili. Per minimizzare tale inconveniente, prima di portare a secco l'estratto, si può aggiungere un'aliquota di soluzione di TBAF, in modo che la sua concentrazione finale risulti essere di 10 mM. Questo consente la formazione di coppie ioniche fenoli-TBA la cui volatilità è molto bassa. Alternativamente si può aggiungere una soluzione di carbonato di sodio in modo da trasformare i fenoli in fenati la cui volatilità è molto bassa.

8. Calcoli

Iniettare nel cromatografo volumi uguali di campione e di soluzioni di riferimento diluite (6.6.2). Costruire quindi le rette di taratura per i singoli fenoli, accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento, riportando in grafico l'area del picco del componente (A) in funzione della concentrazione del componente stesso e interpolando i punti sperimentali con il metodo dei minimi quadrati. Ricavare il coefficiente angolare (a) e l'intercetta (b) della retta di taratura. La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

$$C = \frac{A - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:

C = concentrazione ($\mu\text{g/L}$) di fenolo;
 A = area del picco del fenolo nella miscela incognita;
 b = valore dell'intercetta della retta di taratura;
 a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
 V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
 V_i = volume (mL) del campione acquoso.

Nel caso in cui si utilizzi il riferimento interno, si riporta in grafico il rapporto area picco componente/area picco riferimento interno (A/A_{si}) in funzione della concentrazione del componente stesso. La concentrazione incognita di ogni componente (C), espressa in $\mu\text{g/L}$, è data dalla relazione:

$$C = \frac{A/A_{si} - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:

C = concentrazione ($\mu\text{g/L}$) di fenolo;
 A = area del picco del fenolo nella miscela incognita;
 A_{si} = area del picco del riferimento interno nella miscela incognita;
 b = valore dell'intercetta della retta di taratura;
 a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
 V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
 V_i = volume (mL) del campione acquoso.

9. Qualità del dato

Le iniezioni del campione e delle soluzioni di riferimento vanno ripetute almeno due volte al fine di migliorare l'accuratezza delle misure sperimentali. Per verificare la ripetibilità della risposta strumentale si consiglia di effettuare 10 iniezioni di una delle soluzioni di riferimento. Le procedure sperimentali sopra riportate sono state verificate mediante una sperimentazione interlaboratorio che ha coinvolto 5 laboratori di riferimento nazionali. Detta sperimentazione ha consentito di stabilire che i recuperi dei vari fenoli sono superiori al 75% con un coefficiente di variazione inferiore al 10%.

Pertanto si consiglia di ripetere il procedimento di concentrazione qualora, durante la procedura di concentrazione, venga riscontrato un recupero inferiore al 50%.

Nota: si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".

Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", XX Ed. (Washington, APHA).

ASTM (1981): "Annual Book of ASTM Standards", Part 31, Water, Method D 1783.

BAID R.B., CAEMONA L.G. & JENKINS R.L. (1977): "The direct-injection GLC analysis of Xylenols in industrial wastewaters", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **17**, 764-767.

BALDWIN D.A. & DEBOWSKI J.K. (1988): "Determination of phenols by HPLC down to ppt levels", *Chromatographia*, **26**, 186-190.

BUIKEMA A.L., MCGINNIS M.J. & CAIRNS J.JR. (1979): "Phenolics in aquatic ecosystems: a selected review of recent literature", *Marine Environ. Res.*, **2**, 87-181.

DI CORCIA A., PASSARIELLO G.M., MARCHESE S. & CAPRI S. (1997): "Dosaggio di fenoli nelle acque: estrazione per mezzo di Carbon Black grafitizzato e quantificazione mediante HPLC", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, gennaio 1997, 1-10.

EMERSON E., BEACHAM H.H. & BEAGLE L.C. (1943): "The Condensation of Aminoantipyrine. II. A New Color Test for Phenolic Compounds", *J. Org. Chem.* **8**, 417.

KOZAK V.P., SIMSIMAN G.V., CHESTERS G., STENSBY D. & HARKIN J. (1979): "Reviews of Nat. Lab.", ORNL/EIS-128, EPA/600/10.

LACORTE S. & BARCELO D. (1994): "Rapid degradation of fenitrothion in estuarine waters", *Environ. Sci. Technol.*, **28**, (6), 1159-1163.

ONG C.P., LEE H.K. & LI S.F.Y. (1989): "Optimization of mobile phase composition for HPLC analysis of eleven priority substituted phenols", *J. Chromatogr.*, **462**, 405-410.

REALINI P.A. (1981): "Determination of priority pollutants phenols in water by HPLC", *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 124.

5080. Idrocarburi policiclici aromatici

Introduzione

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) rappresentano una delle più significative classi di composti chimici il cui monitoraggio in varie matrici ambientali, quali aria, acqua e sedimenti, è di fondamentale importanza allo scopo di valutare l'impatto che questi inquinanti hanno sull'ambiente e sull'uomo.

L'attenzione allo sviluppo di metodi di identificazione e successiva quantificazione degli idrocarburi policiclici aromatici in varie matrici ambientali è legata alla riconosciuta azione cancerogena che alcuni di questi composti hanno dimostrato.

Questi idrocarburi sono il risultato di diverse attività industriali; possono inoltre essere rilasciati nelle acque potabili dal rivestimento bituminoso delle tubature. In ragione della loro natura idrofobica e della loro bassa solubilità tendono ad accumularsi nel particolato aeriforme organico ed inorganico che sotto l'azione degli agenti atmosferici può essere diffuso in tutto l'ecosistema.

Gli IPA si sviluppano durante i processi di combustione incompleta di combustibili fossili come carboni e petroli, nella combustione della biomassa e dalle emissioni del traffico veicolare. L'origine di tali composti è prevalentemente di tipo antropico, ma esistono anche delle fonti di tipo naturale come l'autocombustione delle foreste o biosintesi ad opera di batteri, funghi ed alghe (questa sintesi avviene in misura maggiore nei sedimenti profondi e anaerobici). Gli IPA sono inquinanti ubiquitari in quanto possono essere ritrovati in tracce anche in ambienti remoti, quindi lontani dall'attività industriale principale responsabile della loro produzione, per opera del trasporto e delle precipitazioni atmosferiche.

Gli IPA per la loro lipofilità presentano mediamente una solubilità piuttosto ridotta (<1 mg/L) che tende comunque a diminuire con l'aumento del peso molecolare. Per questo motivo questi composti tendono a lasciare la fase acquosa ed a formare legami con le particelle in sospensione o a depositarsi nei sedimenti dove è presente una grande quantità di carbonio organico. Un altro comparto verso il quale gli IPA presentano particolare affinità è il biota, per la presenza di grassi nei tessuti degli organismi. Questo rappresenta un grave problema ecotossicologico poiché, pur dimostrando bassa tossicità acuta, alcuni IPA si sono rivelati degli agenti cancerogeni e genotossici.

La pericolosità di questi composti dipende anche dalla loro persistenza che diventa molto elevata quando sono presenti più di due o tre anelli o quando le condizioni ambientali sono riducenti. La tossicità può aumentare in seguito all'esposizione alla luce, in particolare ai raggi UV.

La degradazione degli IPA può avvenire con una reazione relativamente rapida sull'interfaccia acqua-sedimento a carico di alcuni batteri aerobi. Questi microrganismi possiedono degli enzimi in grado di incorporare una molecola di ossigeno ad ogni singolo anello aromatico sotto forma di due gruppi ossidrilici. Il prodotto della reazione è un intermedio aromatico chiamato catecolo. I gruppi ossidrilici hanno una funzione destabilizzante in quanto l'ulteriore incorporazione di una molecola di ossigeno al catecolo porta all'apertura dell'anello aromatico. Il composto così generato è un acido carbossilico che viene successivamente scisso a formare degli intermedi del ciclo di Krebs. Nei sedimenti più profondi, invece, tale reazione è per lo più inibita in quanto l'ossigeno disciolto nella colonna d'acqua diffonde molto lentamente nei sedimenti e viene rapidamente utilizzato dai microrganismi presenti sull'interfaccia acqua-sedimento. In questo modo nelle zone sottostanti vengono a crearsi delle condizioni di anaerobiosi che rendono impossibile la degradazione precedentemente descritta.

1. Principio del metodo

Il metodo prevede la determinazione quantitativa di alcuni tra i principali idrocarburi policiclici aromatici in campioni di acque potabili, di falda, superficiali e di scarico mediante estrazione liquido-liquido o su fase solida ed analisi in gascromatografia/spettrometria di massa (HRGC/LRMS) con detector a selezione di massa, oppure in cromatografia liquida (HPLC) con rivelatore ultravioletto (UV) e a fluorescenza.

Nel caso di matrici complesse l'analisi in HRGC/LRMS deve essere preceduta da una purificazione dell'estratto organico su gel di silice in modo da isolare la frazione contenente gli idrocarburi policiclici aromatici dagli interferenti idrocarburi alifatici.

Il riconoscimento e la quantificazione dei singoli IPA è basata sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi del cromatogramma ottenuto dall'analisi dell'estratto organico del campione acquoso con quelli ottenuti da idonee soluzioni di riferimento.

La determinazione quantitativa degli IPA viene effettuata con le aree dei rispettivi picchi cromatografici sulla base di opportune rette di taratura di soluzioni di riferimento.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente di dosare gli analiti riportati in Tab. 1 ad una concentrazione non inferiore a 0,005 µg/L.

Tabella 1: Idrocarburi policiclici aromatici analizzabili con il presente metodo

	Composto
1	naftalene
2	acenaftene
3	acenaftilene
4	fluorene
5	fenantrene
6	antracene
7	fluorantene
8	pirene
9	benzo (a) antracene
10	crisene
11	benzo (k) fluorantene
12	benzo (j) fluorantene
13	benzo (b) fluorantene
14	benzo (a) pirene
15	benzo (e) pirene
16	perilene
17	dibenzo (a,h) antracene
18	indeno (1,2,3-c,d) pirene
19	benzo (g,h,i) perilene

Oltre ai composti riportati in Tab. 1, il metodo consente la determinazione di altri idrocarburi con caratteristiche simili.

3. Interferenze e cause di errore

Tutti quei composti organici con tempi di ritenzione coincidenti a quelli dei composti in esame possono essere considerati interferenti; procedimenti di purificazione utilizzati per isolare gli IPA possono ridurre al minimo queste interferenze.

Solventi, reagenti, vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro possono essere causa di artefatti ed elevate linee di base che possono determinare errori nell'interpretazione dei dati

cromatografici. Si deve dimostrare che tutti i materiali non diano interferenze nelle condizioni di analisi adottate con l'utilizzo di prove in bianco.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione vengono eseguiti conformemente alle norme generali riportate nella Sezione 1030 "Metodi campionamento". Il campionamento deve essere effettuato in bottiglie di vetro della capacità 1-2 L. Le bottiglie e i tappi (possibilmente con sottotappi in teflon) devono essere risciacquati con acetone e seccati prima dell'uso. I campioni vanno conservati al buio ed in frigorifero a 4°C (è consigliabile effettuare le operazioni di estrazione il più presto possibile e comunque non oltre 48 ore).

5. Apparecchiature

Normale vetreria di laboratorio che dopo il lavaggio deve essere sciacquata con acqua bidistillata, con acetone e seccata prima dell'uso.

5.1 *Bottiglie di vetro da 1 o 2 L*

5.2 *Imbuti separatori di vetro Pyrex di varie capacità con rubinetto e tappi di teflon.*

5.3 *Matracci e pipette (classe A) di varie capacità ed accuratamente pulite.*

5.4 *Flaconi di vetro di varie capacità con tappi in gomma teflonata.*

5.5 *Microsiringhe per liquidi di varie capacità.*

5.6 *Palloni da 250 mL in Pyrex con cono normalizzato.*

5.7 *Bilancia analitica*

5.8 *Evaporatore rotante*

5.9 *Colonne per cromatografia in vetro (1 cm d.i., 30 cm lunghezza) dotate di setto poroso G0, rubinetto in teflon e serbatoio da 50 mL.*

5.10 *Gasromatografo, equipaggiato con colonne capillari e rivelatore a selezione di massa con sistema di integrazione dati (HRGC/LRMS).*

In alternativa:

5.11 *HPLC*

Si consiglia l'uso di uno strumento dotato di rivelatore UV (a lunghezza d'onda variabile) e/o fluorescenza e di colonna a fase inversa. La fase mobile è costituita da una miscela di acetone/acqua o metanolo/acqua. L'analisi viene effettuata in gradiente la cui composizione e durata, così come il flusso di lavoro, dipende dal tipo e dalle dimensioni della colonna utilizzata.

5.12 *Colonna capillare per GC e colonna per HPLC*

6. Reattivi

- 6.1 *Acqua bidistillata* esente da sostanze interferenti.
- 6.2 *Solventi (esano, cicloesano, diclorometano, etilacetato, metanolo, acetonitrile, pentano, acetone)* per uso pesticidi.
- 6.3 *Sodio solfato anidro*
- 6.4 *Sodio cloruro RPE per analisi*
- 6.5 *Gel di silice 70/230 mesh*
- 6.6 *Cartucce per estrazione in fase solida* (es. Empore disc C₈ 47 mm).
- 6.7 *Lana di vetro silanizzata*
- 6.8 *Riferimenti interni deuterati: naftalene D8, acenaftene D10, fenentrene D10, crisene D12, perilene D12.*
- 6.9 *Soluzioni di riferimento concentrate di IPA (1000 mg/L)*

Per la preparazione delle soluzioni di riferimento per la taratura devono essere impiegati composti di purezza superiore al 98%.

I riferimenti primari si preparano pesando esattamente in un matraccio tarato da 25 mL una quantità di 25 mg di ciascun idrocarburo e portando a volume con metanolo.

Queste soluzioni madri possono essere conservate in congelatore e sono stabili per sei mesi se conservate in congelatore, per due mesi se conservate in frigorifero a 4°C. In modo analogo vengono preparate le soluzioni concentrate per i riferimenti interni ad una concentrazione nominale di 500 mg/L.

Possono essere utilizzate soluzioni di riferimento multicomponente ad una concentrazione di 2000 mg/L purchè vendute con certificato di analisi.

6.10 *Soluzione di riferimento diluita di IPA (20 mg/L)*

In un matraccio tarato da 25 mL introdurre 0,5 mL di ciascuna delle soluzioni da 1000 mg/L ad esclusione dei riferimenti interni e portare a volume con metanolo. Nel caso si utilizzino soluzioni di riferimento multicomponente già preparate queste vengono diluite in modo da ottenere una soluzione a 20 mg/L.

La soluzione dei riferimenti interni (SI metanolo) da utilizzare per le soluzioni di riferimento diluite viene preparata prelevando 1 mL delle soluzioni concentrate di ciascun componente e portando a volume in un matraccio tarato da 50 mL con metanolo.

La soluzione dei riferimenti interni da aggiungere al campione (SI acetone) viene preparata prelevando 0,1 mL delle soluzioni concentrate di ciascun componente e portando a volume in un matraccio tarato da 50 mL con acetone. La soluzione conservata in fiale silanizzate e in congelatore è stabile per due mesi.

6.11 *Soluzioni diluite per taratura*

Le soluzioni diluite utilizzate per la taratura sono ottenute diluendo opportunamente con metanolo la soluzione diluita di IPA (6.10).

6.11.1 *Soluzione di riferimento IPA a 2 mg/L (Stdipa2)*

In un matraccio tarato da 10 mL introdurre 1,0 mL della soluzione diluita (6.10) e 1,0 mL della soluzione SI metanolo e portare a volume con metanolo.

6.11.2 Soluzione di riferimento IPA a 0,2 mg/L (Stdipa02)

In un matraccio tarato da 10 mL introdurre 0,1 mL della soluzione diluita (6.10) e 1,0 mL della soluzione SI metanolo e portare a volume con metanolo.

7. Procedimento

7.1 Estrazione

7.1.1 Estrazione liquido/liquido

Trasferire quantitativamente il campione di acqua in un imbuto separatore da 2 L. Risciacquare accuratamente la bottiglia con 50 mL di diclorometano.

Aggiungere il riferimento interno 0,1 mL (SI acetone) agitando per una accurata distribuzione. Aggiungere il solvente di estrazione diclorometano (50 mL), agitare vigorosamente per 2 minuti. Lasciare decantare e trasferire l'estratto ottenuto in un pallone da 250 mL. Ripetere l'estrazione altre due volte con uguali aliquote di solvente (50÷60 mL). Riunire gli estratti e anidricarli con solfato di sodio anidro.

Concentrare a piccolo volume (circa 5 mL) l'estratto organico con evaporatore rotante; la temperatura del bagno termostatico non deve essere superiore a 40°C.

Dopo aver concentrato l'estratto a circa 1 mL sotto flusso di azoto trasferirlo quantitativamente in una fiala da 4 mL con diclorometano.

Fare attenzione durante le fasi di concentrazione a non andare a secco con l'estratto per non perdere gli IPA più volatili.

7.1.2 Estrazione su fase solida

Gli analiti vengono estratti tramite estrazione su fase solida (SPE) utilizzando Empore disk C₁₈ (o cartuccia C₁₈). Lavare il disco con 10 mL di diclorometano e condizionarlo aggiungendo metanolo (10 mL) sotto vuoto. Rimuovere l'eccesso di solvente con acqua esente da contaminanti organici (10 mL). Far passare 2 litri di campione contenente 10 mL di metanolo attraverso il disco sotto un vuoto di 10 cm di Hg.

Durante questa operazione è necessario prevenire che il disco vada a secco controllando il vuoto e chiudendolo al momento opportuno.

Alla fine della filtrazione, far passare aria attraverso la membrana per alcuni minuti per rimuovere l'eccesso di acqua.

Eluire gli analiti facendo passare diclorometano (10 mL) con un vuoto moderato (circa 0,5 cm di Hg). Raccogliere l'eluato in provetta graduata e concentrare sotto flusso di azoto a temperatura ambiente a piccolo volume (esattamente misurato).

7.2 Purificazione dell'estratto su colonna di gel di silice

7.2.1 Preparazione della fase stazionaria

Purificare il gel di silice con diclorometano in Soxhlet per 12 ore. Evaporare il solvente residuo con evaporatore rotante e successivamente in stufa a 35°C. Attivare il gel di silice in stufa a 250°C per 16 ore e raffreddarlo in essiccatore sotto vuoto.

Attivare il sodio solfato a 400°C per 8 ore e raffreddarlo in essiccatore sotto vuoto. Le fasi stazionarie, conservate in essiccatore sotto vuoto, sono attive per 5 giorni.

7.2.2 Preparazione della colonna cromatografica

Pesare in una beuta da 50 mL, munita di tappo smeriglio, 6,0 g di gel di silice, aggiungere 5 mL di una miscela esano/acetone 8:2 (v:v) e chiudere la beuta. Agitare e lasciare la beuta immersa in un bagno ad ultrasuoni per 5 minuti.

Introdurre nella colonna cromatografica pochi millilitri di esano. Trasferire nella colonna parzialmente riempita con esano, il gel di silice avendo cura che non si formino bolle d'aria. Aggiungere 2,0 g di solfato di sodio mantenendo la colonna sempre bagnata da esano. Condizionare la colonna con 10 mL di esano degasato mediante ultrasuoni.

7.2.3 Eluizione cromatografica

Portare l'estratto del campione proveniente dal trattamento 7.1.1 ad un volume di 0,5 mL in esano mediante leggero flusso di azoto (prepurificato per passaggio su setacci molecolari) e caricare quantitativamente il campione aiutandosi se necessario con una piccola quantità di esano. Eluire per gravità in successione con:

- 30 mL di esano (prima frazione di scarto contenente gli alifatici);
- 20 mL acetone/esano 1:1 (v/v) (seconda frazione contenente gli IPA).

Concentrare lentamente la seconda frazione in evaporatore rotante fino a 0,5 mL (evitando di andare a secco), quindi trasferirla in una fiala da 1,8 mL aiutandosi con esano. Aggiustare il volume fino ad una quantità nota compresa tra 0,5-1 mL (con esano o mediante leggero flusso di azoto, prepurificato per passaggio su setacci molecolari) a seconda delle concentrazioni attese. Fino al momento dell'analisi conservare l'estratto a 4°C al buio.

7.3 Analisi dell'estratto

7.3.1 Analisi in HRGC/LRMS

L'estratto organico proveniente dalla procedura di estrazione 7.1.1 o 7.1.2 può essere analizzato direttamente in HRGC/LRMS oppure, nel caso di matrici complesse, sottoposto a purificazione su colonna di gel di silice come descritto in (7.2) e poi analizzato.

È opportuno prima di iniziare l'analisi porre il forno alla massima temperatura raggiunta dall'analisi e monitorare la linea di base fino a che questa resti costante.

L'acquisizione di dati viene eseguita sui soli ioni caratteristici dei composti da analizzare. Qui di seguito viene riportata a titolo di esempio la tabella con gli ioni di quantificazione e conferma di una serie di IPA. È compito dell'operatore valutare la necessità di inserire altri ioni a seconda delle richieste.

Analita	Massa M1 quantificazione	Massa M2 Conferma	% M2/M1	Calcoli con riferimento interno
Naftalene	128	64	6	Naftalene D8
Acenatilene	152	76	13	Naftalene D8
Acenaftene	154	152	51	Acenaftene D10
Fluorene	166	164	12	Acenaftene D10
Fenantrene	178	89	8	Fenantrene D10
Antracene	178	89	9	Fenantrene D10
2-fenilnaftalene	204	101	11	Fenantrene D10
Fluorantene	202	101	9	Fenantrene D10
Pirene	216	101	12	Fenantrene D10
Benzo(a)fluorene	216	215	74	Fenantrene D10
Benzo(b)fluorene	228	215	74	Fenantrene D10
Benzo(a)antracene	228	114	7	Fenantrene D10
Crisene	252	114	7	Crisene D12
Benzo(a)fluoranteni (b+k+i)	252	126	8	Crisene D12
benzo(e)pirene	252	126	6	Crisene D12
benzo(a)pirene	252	126	6	Crisene D12
Perilene	276	126	8	Perilene D12

segue

segue

Analita	Massa M1 quantificazione	Massa M2 Conferma	% M2/M1	Calcoli con riferimento interno
indeno(1, 2, 3-cd) pirene	278	138	3	Perilene D12
Dibenzo(a,h) antracene	276	139	3	Perilene D12
Coronene	300	138	6	Perilene D12
		150	6	Perilene D12
Riferimento interno	Massa M1 quantificazione			Recupero medio % ± scarto tipo
Naftalene D8	136			85,2 ± 3,1
Acenaftene D10	164			91,4 ± 2,1
Fenantrene D10	188			93,1 ± 2,2
Crisene D12	240			89,8 ± 2,9
Perilene D12	364			88,4 ± 3,3

In Fig. 1 è riportato un tipico cromatogramma ottenuto analizzando l'estratto in HRGC/LRMS.

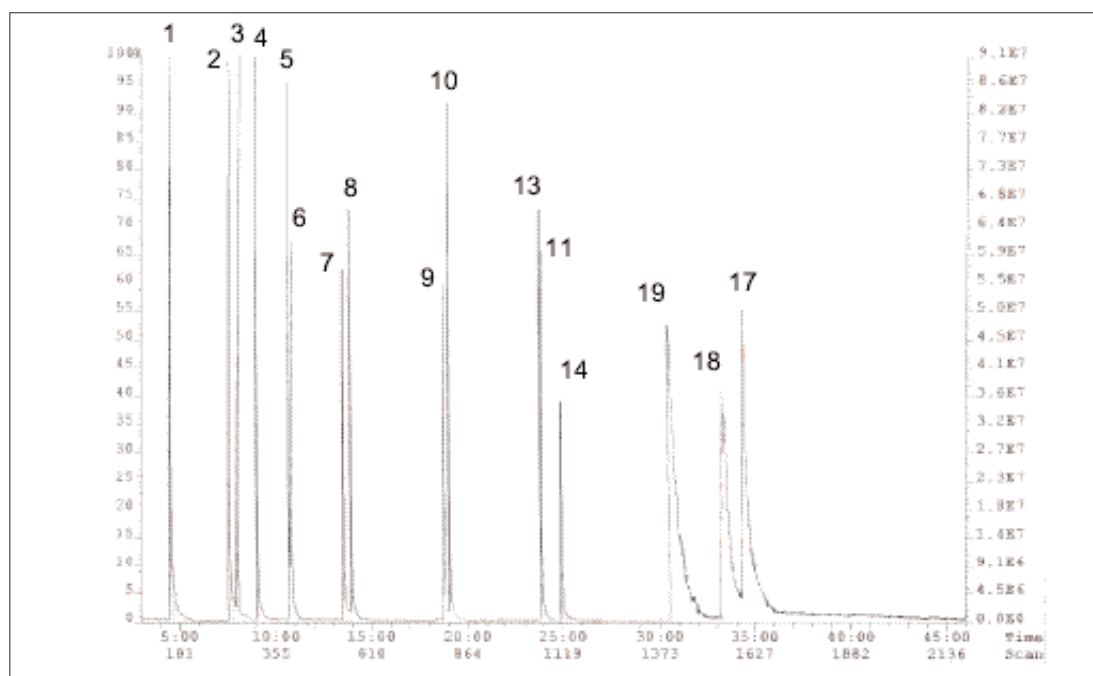


Figura 1: Cromatogramma di un campione di acqua di falda contaminato con 20 ppb di alcuni IPA ottenuto analizzando l'estratto in HRGC/LRMS. Condizioni gas-cromatografiche: iniettore "splitless" ("liner" silanizzato da 800 µL); T = 295°C, "purge" time = 45 sec; linea di trasferimento MS a 300°C; temperatura forno 60°C per 1 minuto, rampa a 25°C/min fino a 200°C, rampa a 10°C/min fino a 270°C, isoterma per 6 minuti, rampa a 25°C/min fino a 295°C, isoterma per 12 minuti; gas di trasporto elio a 10 psi, flusso di "split" 60 mL/min. Condizioni operative dello spettrometro di massa: temperatura sorgente = 260°C, sorgente ad impatto elettronico (EI), potenziale di ionizzazione 70 eV.

7.4 Analisi in HPLC/fluorescenza

Per effettuare l'analisi in HPLC/fluorescenza l'estratto organico proveniente dalla procedura di estrazione (7.1.1 o 7.1.2) deve essere reso compatibile con la fase mobile impiegata. Ciò viene realizzato concentrando a 100 µL l'estratto in diclorometano e aggiungendo acetoni-trile fino ad un volume finale di 1 mL.

Il rivelatore a fluorescenza viene usato per la determinazione simultanea dei differenti com-

posti. Le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione vengono variate in dipendenza del tipo di colonna e delle condizioni cromatografiche utilizzate. A titolo di esempio, nella seguente Tab. 2 sono riportate le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione utilizzate nel cromatogramma di Fig. 2.

Tabella 2: Tempi di ritenzione e lunghezza d'onda

Tempo di ritenzione (min)	eccitazione (nm)	emissione (nm)
< 0	250	360
17,9	375	425
20,5	335	440
24,8	350	430
33,5	305	500

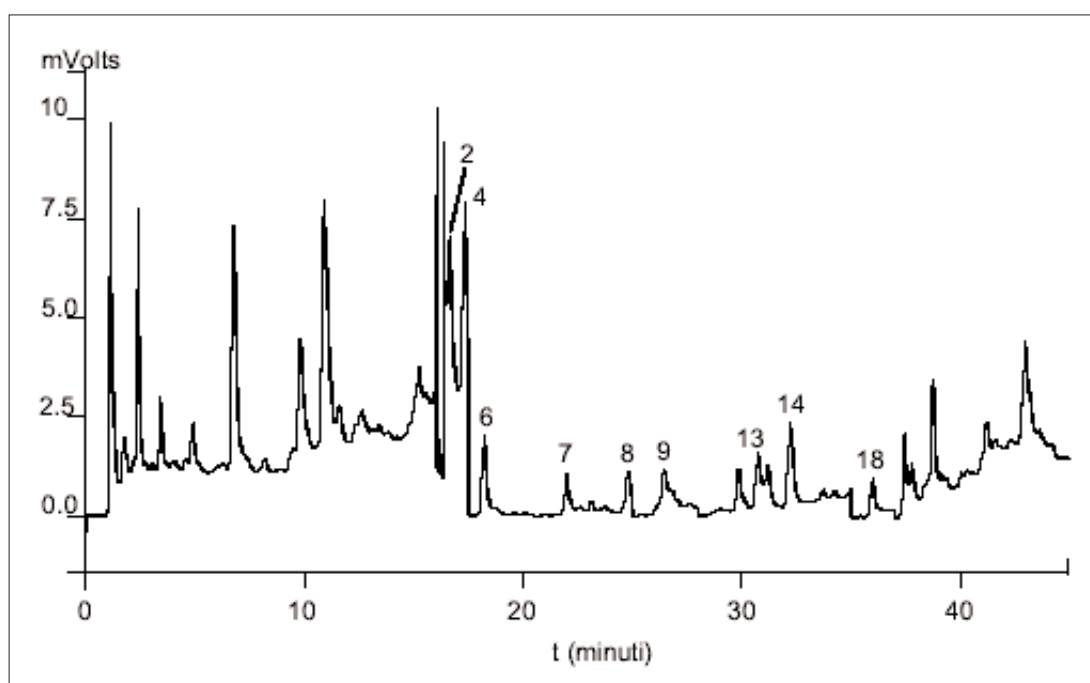


Figura 2: Cromatogramma di un campione di acqua superficiale contaminato con 0,1 ppb di alcuni IPA ottenuto analizzando l'estratto in HPLC/fluorescenza. Condizioni operative: colonna C_{18} (Analytical Technology) (250 x 4 mm, 5 μ m), flusso = 1 mL/min, 50/50 acqua/acetonitrile (isocratica per 6 min), gradiente a 30/70 in 24 min, gradiente a 20/80 in 10 min, gradiente a 0/100 in 10 min; volume iniettato = 10 μ L.

8. Calcoli

Iniettare nel cromatografo volumi uguali di estratto e di soluzioni di riferimento diluite (6.11). Costruire quindi le rette di taratura per i singoli IPA, accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento. La quantificazione viene effettuata mediante la tecnica del riferimento interno.

Riportare in grafico il rapporto area picco componente/area picco riferimento interno (A/A_{si}) in funzione della concentrazione del componente stesso.

La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

$$C = \frac{A/A_{si} - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:

C = concentrazione ($\mu\text{g/L}$) di analita;
A = area del picco dell'analita nella miscela incognita;
 A_{si} = area del picco del riferimento interno nella miscela incognita;
b = valore dell'intercetta della retta di taratura;
 α = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
 V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
 V_i = volume (mL) del campione acquoso.

9. Qualità del dato

Le iniezioni del campione e dei riferimenti interni vanno ripetute almeno due volte al fine di migliorare l'accuratezza delle misure sperimentali. Per verificare la ripetibilità della risposta strumentale si consiglia di effettuare 10 iniezioni di una delle soluzioni di riferimento. Valutare il recupero dei riferimenti interni effettuando cinque determinazioni su una matrice reale.

Il recupero di ogni riferimento interno calcolato rispetto alla soluzione di lavoro deve essere maggiore del 50%. Si raccomanda di riestrarre e rianalizzare i campioni, i cui recuperi sono inferiori al 40% o maggiori del 120%.

Nota: si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico". Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", XX Edition, (Washington, APHA).

GUIDOTTI M. (1996): "Presenza di idrocarburi policiclici aromatici e composti organoclorurati persistenti in sedimenti di acque superficiali", *Acqua e aria*, **9**, 783-785.

IRSA (1999): "Metodi analitici per i fanghi - Idrocarburi policiclici aromatici", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **64**, Roma.

MC CONKEY B.J., DUXBURY C.L., DIXON D.G. & GREENBERG B.M. (1997): "Toxicity of PAH photooxidation product to the bacteria *Photobacterium Phosphoreum* and the duckweed *Lemna Gibba*: effects of phenanthrene and its primary product phenanthroquinone", *Environ. Toxicol. and Chemistry*, **16**, 892-899.

WILCOCK R.J., CORBAN G.A., NORTHCOTT C.L. & LANGDON A.G. (1995): "Persistence of polycyclic aromatic compounds of different molecular size and water solubility in surficial sediment of interstitial sandflat", *Environ. Toxicol. and Chemistry*, **15**, 670-676.

5090. Pesticidi clorurati

I pesticidi clorurati sono composti organici clorurati ad attività insetticida con meccanismo di azione prevalentemente a danno del sistema nervoso. Questi prodotti, unitamente all'esaclobenzene ed al captano aventi proprietà spiccatamente fungicide, costituiscono una classe di pesticidi di grande rilevanza dal punto di vista della contaminazione ambientale per le caratteristiche di persistenza e tossicità.

Il metodo descritto permette la determinazione dei pesticidi clorurati nelle acque di scarico. Alcune considerazioni possono essere fatte sulla procedura analitica. Qualsiasi metodo di estrazione capace di rimuovere efficacemente dal campione queste sostanze clorurate per la successiva analisi, può estrarre contemporaneamente anche elevate quantità di sostanze potenzialmente interferenti che in un'acqua di scarico sono generalmente molto abbondanti e di varia natura e possono ostacolare una accurata determinazione analitica. Varie fasi di purificazione dell'estratto possono quindi essere indispensabili e nel metodo ne vengono suggerite alcune, selezionate sulla base della loro efficacia.

In ogni caso, per ridurre la possibilità di errore, l'applicazione della procedura descritta più avanti richiede personale addestrato a questo tipo di determinazioni e l'effettuazione di periodici controlli di qualità. Inoltre, nel caso di risposte positive è ovvio che il chimico responsabile dell'analisi curerà la conferma del risultato con adeguate procedure.

Una importante osservazione deve essere fatta riguardo ai policlorobifenili (PCB). Questi sono composti che presentano un comportamento analogo, nelle diverse fasi della procedura analitica, ai pesticidi clorurati. Anche nella attuale normativa essi sono in genere assimilati ai pesticidi organoclorurati (così come nei metodi EPA per il controllo delle acque di scarico sia civili che industriali), nonostante la diversa utilizzazione e la diversa tossicità. Nonostante ciò, per esigenze schematiche, le procedure di analisi sono descritte in due metodi separati. In questo metodo i PCB sono inclusi nelle interferenze. Per la loro analisi si rimanda al metodo specifico 5110 basato su numerosi riferimenti al presente metodo. Si ricorda infine che la maggior parte dei pesticidi clorurati presi in esame è attualmente soggetta a divieti d'uso come fitofarmaci e quindi è anche limitatissima la produzione, indirizzata quasi esclusivamente alla esportazione. Per quanto riguarda i PCB, dei quali è vietata la produzione e l'uso, la loro eventuale presenza nelle acque di scarico può in generale derivare da operazioni di manutenzione o smantellamento di trasformatori contenenti miscele commerciali di questi composti utilizzati come additivi per gli oli.

1. Principio del metodo

Il metodo consiste in una estrazione liquido-liquido con miscela n-esano/diclorometano, una purificazione preliminare per ripartizione con acetone nitrile, una fase di desolfurazione seguita da una purificazione/frazionamento per cromatografia su gel di silice ed infine un'analisi gascromatografica con rivelatore a cattura di elettroni. L'operatore, in base alla sua esperienza e in base ad eventuali notizie sul campione (provenienza, possibile presenza di sostanze interferenti, ecc.) potrà, nell'ambito della procedura successivamente descritta, operare delle scelte; potrà scegliere il volume di campione da sottoporre all'analisi e il volume finale al quale concentrare l'estratto, ma soprattutto potrà decidere riguardo all'opportunità o meno di procedere ad una o più fasi di purificazione. Iniezioni dell'estratto concentrato prima delle operazioni di purificazione, anche se possono dare all'operatore informazioni molto utili sull'opportunità delle successive fasi di purificazione, sono in genere sconsigliate perché possono determinare la necessità di intervenire sul rivelatore o sulla colonna per ripristinarne l'efficienza analitica.

L'eliminazione di oli e grassi, spesso presenti nell'estratto di un'acqua di scarico, per ripartizione con acetonitrile, è preferibile al trattamento acido o alcalino che, anche se economico, veloce ed efficiente, distrugge parzialmente o totalmente alcuni pesticidi organoclorurati. La successiva cromatografia con silice disattivata, ampiamente sperimentata e utilizzata permette un'ulteriore purificazione ed un frazionamento dei composti organoclorurati utile per la loro identificazione.

Per quanto riguarda la determinazione finale, alcune delle colonne gascromatografiche con le più idonee fasi stazionarie attualmente reperibili in commercio sono riportate nella sezione relativa alla determinazione gascromatografica. Nel metodo sono indicate altresì le più probabili interferenze, che si possono incontrare nella determinazione di composti organoclorurati in un'acqua di scarico, e alcune tra le migliori tecniche per la loro minimizzazione o eliminazione. L'analisi qualitativa si basa sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi osservati nel campione con quelli di idonee soluzioni di riferimento. Per la conferma dell'identità delle sostanze individuate è consigliato l'uso di colonne a differente polarità o, nel caso in cui il laboratorio ne sia provvisto, di un rivelatore di massa operante in SIM (Selected Ion Monitoring). La determinazione quantitativa dei pesticidi organoclorurati è basata sul confronto delle aree dei picchi nel campione e nella soluzione di riferimento. I risultati sono di norma espressi in µg/L.

2. Campo di applicazione

Il metodo permette la determinazione di pesticidi clorurati nelle acque di scarico. In Tab. 1 è riportato l'elenco delle sostanze che possono essere determinate con il presente metodo. La normativa vigente stabilisce un limite di 0,05 mg/L di pesticidi totali, esclusi i fosforati ma inclusi i PCB e i PCT, nelle acque di scarico (Tab. 3, All. 5 del D.Lgs. 152/99).

Tabella 1: Elenco dei pesticidi clorurati analizzabili con il presente metodo

Esaclorobenzene (HCB)* (pentaclorobenzene)	p,p'-DDT* (o,p'-DDT)
Aldrina*	(p,p'-DDE)
Endrina*	(o,p'-DDE)
(endrina aldeide)	(p,p'-DDD)
Dieldrina*	(o,p'-DDD)
HCH esaclorocicloesano: isomeri α, β, δ*	α~clordano*
γ-HCH [lindano]	γ-clordano*
Dicofol [Keltane]	endosulfan α
Pertane	endosulfan β
Eptacloro*	metossicloro
(eptacloro epossido)	captano

* Sostanza il cui impiego in agricoltura o nell'igiene pubblica è vietato o sottoposto a restrizioni di impiego.

() Prodotti di degradazione o principali impurezze di produzione.

Nota: nell'elenco sono compresi solo composti normalmente classificati come pesticidi clorurati. Non sono stati considerati altri pesticidi che, pur contenendo atomi di cloro o di altri alogeni, sono classificati in base ad altri gruppi funzionali presenti nella molecola (ad esempio erbicidi quali atrazina; 2,4-D).

Il controllo dei limiti di accettabilità imposti dalla attuale normativa per le acque di scarico non pone problemi; infatti il presente metodo di analisi ha un limite di quantificazione per singolo composto in esame inferiore a 0,1 µg/L, ampiamente adeguato ai suddetti limiti normativi (e comunque può essere, senza problemi, ulteriormente abbassato, fino a 1 ng/L, concentrando l'estratto da iniettare per l'analisi gascromatografica a volumi più piccoli di quelli previsti dal metodo).

Per quanto riguarda i volumi di campione da sottoporre all'analisi, in considerazione dei limiti di rivelabilità del metodo e dei limiti di legge, un volume di acqua di 100-500 mL è generalmente sufficiente per le acque di scarico.

3. Interferenze e cause di errore

Solventi, reagenti, vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro ed ogni trattamento del campione possono causare problemi e portare alla presenza di picchi interferenti nei cromatogrammi e/o alterazioni della corrente di fondo del rivelatore con conseguenti difficoltà di interpretazione e/o interpretazioni errate del tracciato gascromatografico. Tutti i materiali utilizzati pertanto devono essere esenti da interferenze nelle condizioni operative adottate. È quindi buona norma di laboratorio, all'inizio dell'indagine e periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi" sostituendo al campione acqua distillata, per la verifica di eventuali interferenze provenienti da materiali e reagenti. Nel caso di presenza di interferenze, individuarne la provenienza, analizzando ogni singolo passaggio della procedura e procedere alla loro eliminazione. Può essere richiesta una specifica selezione dei reattivi ed una purificazione dei solventi per mezzo di distillazione.

Le sostanze di varia natura coestratte insieme ai pesticidi organoclorurati dagli effluenti industriali sono spesso in quantità non trascurabile e possono causare difficoltà nell'ottenere misure precise ed accurate, soprattutto quando si usa un rivelatore a cattura di elettroni.

Uno dei maggiori problemi nelle determinazioni gascromatografiche di inquinanti organici con rivelatore a cattura di elettroni è rappresentato dagli esteri ftalici, una classe di plastificanti contenuti in varie percentuali nei comuni materiali plastici flessibili dai quali sono facilmente estratti producendo picchi interferenti nel gascromatogramma. Essendo di vastissima diffusione ambientale possono anche provenire dallo stesso laboratorio che effettua le analisi. La loro interferenza può essere mitigata evitando l'uso di questi materiali in laboratorio.

Può essere inoltre necessaria una purificazione dei reagenti (distillazione dei solventi e trattamento in muffola degli altri materiali) e della vetreria (lavaggio con solventi) per eliminare una contaminazione di fondo. Con la purificazione dell'estratto su gel di silice disattivato descritta nel metodo, gli ftalati non vengono eluiti e la loro interferenza viene eliminata.

Altra sostanza che può causare seria interferenza è lo zolfo; la sua interferenza si può manifestare con la saturazione del rivelatore a cattura di elettroni, o, se il livello è più basso, con la presenza di tre o più picchi che possono interferire nella determinazione degli HCH e dell'aldrina. Numerosi sono i metodi descritti in letteratura per rimuovere lo zolfo.

Per la rimozione di composti dello zolfo dall'estratto si possono usare i seguenti metodi: trattamento con solfito di tetrabuttilammonio, che converte lo zolfo a tiosolfato; trattamento con una lega rame-alluminio, trattamento con nickel Raney o potassio idrossido; cromatografia con un adsorbente desolforante costituito da allumina (disattivata all'11%), solfito di sodio e idrossido di sodio; infine agitazione dell'estratto con una piccola quantità (0,1 g) di polvere di rame attivato che fa precipitare lo zolfo come solfuro di rame. Considerando l'efficacia di rimozione dello zolfo, i recuperi dei composti organoclorurati, la facilità di esecuzione e la tossicità di alcuni reagenti si raccomanda l'uso della cromatografia con l'agente desolforante; quest'ultima procedura è descritta dettagliatamente nel metodo.

Come prima accennato i policlorobifenili (PCB), classe di composti comprendente 209 congeneri, possono essere considerati una delle interferenze più probabili e meno facilmente eliminabili. Per quanto riguarda le tecniche di separazione per cromatografia su colonna, dalla letteratura risulta che la separazione dei PCB dai pesticidi organoclorurati può essere ottenuta solo parzialmente su Florisil, su allumina o su silice. Con la purificazione su gel di silice disattivato, adottata nel presente metodo, i PCB vengono eluiti nella prima frazione con alcuni pesticidi clorurati. L'uso di colonne capillari e di adeguati programmi di temperatura (con tempi di analisi molto lunghi) può permettere una sufficiente anche se non completa risoluzione dei picchi mentre, se disponibile, l'uso di un rivelatore di massa (GC/MS) permette in genere di quantificare anche picchi eventualmente sovrapposti. Si può inoltre adottare la tecnica di Snyder e Reinert lievemente modificata, per il frazionamento del primo eluato proveniente dalla cromatografia su gel di silice disattivato. La separazione dei PCB dal DDT e DDE che ne risulta può essere utile per una identificazione più sicura dei pesticidi organoclorurati. Tale procedura è descritta in dettaglio al Sottoparagrafo (7.3.4).

Anche i polibromobifenili (PBB), che possono essere utilizzati come ritardanti di fiamma, potrebbero causare interferenza. Il PBB più usato ha la sigla PB-6b (Michigan Chem. Co., St. Louis, U.S.A.) ed è costituito prevalentemente da 2,4,5,2',4',5'esabromobifenile; sono tutta-

via presenti altri 8 composti e isomeri (dal pentabromo all'eptabromobifenile) che contribuiscono a dare un gascromatogramma complesso e simile a quello dei PCB. Se nei campioni da analizzare si sospetta, in base al ciclo produttivo dell'azienda, la presenza di PBB è necessario porre attenzione nell'attribuzione degli eventuali picchi nel cromatogramma del campione e, se disponibile, utilizzare un rivelatore di massa (GC/MS).

Un'altra interferenza può essere rappresentata infine da alcuni esteri fosforici che, quando presenti negli effluenti analizzati, possono essere rivelati con il procedimento indicato per i pesticidi organoclorurati. In particolare con la tecnica di purificazione su gel di silice disattivato, essi possono essere presenti nella seconda frazione. Per gli esteri fosforici che presentano sulle più comuni colonne gascromatografiche tempi di ritenzione vicini a quelli dei composti organoclorurati si possono effettuare controlli analitici sia mediante gascromatografia con rivelatore fotometrico per il fosforo o a ionizzazione di metalli alcalini (NPD), sia mediante l'impiego di tecniche ausiliarie di conferma.

4. Campionamento e conservazione del campione

I campioni vanno prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, della capacità di 1 L con chiusura a smeriglio oppure a vite. Prima del riempimento le bottiglie devono essere risciacquate con la stessa acqua che si desidera campionare. Evitare l'uso di qualsiasi dispositivo in plastica. È buona norma prelevare due aliquote per ciascun campione. Se si sospetta che i campioni così prelevati non siano abbastanza rappresentativi della composizione dell'effluente, allora il campionamento andrà effettuato secondo i criteri e le modalità descritte nella Sezione 1030 "Metodi di campionamento", salvo diverse disposizioni di legge.

I campioni possono essere conservati in frigorifero per una settimana. Eventuali degradazioni microbiche possono essere bloccate dall'aggiunta di HCl concentrato (1 mL/L di campione); è comunque necessario accertare in via preliminare che l'aggiunta di HCl non causi alterazioni quali-quantitative di altri composti eventualmente contenuti nel campione da analizzare.

5. Apparecchiature

5.1 *Gasromatografo* che consenta l'impiego di colonne capillari.

5.2 *Rivelatori*

Rivelatore a cattura di elettroni (ECD). Se disponibile, può essere vantaggiosamente adottato il rivelatore di massa (MS) operante in SIM, soprattutto per l'analisi quantitativa di composti non separabili cromatograficamente.

5.3 *Sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati cromatografici*

5.4 *Colonne gascromatografiche*

Le colonne e le fasi stazionarie consigliate per l'analisi dei pesticidi organoclorurati sono descritte nello schema seguente. Si consiglia di utilizzare colonne con rapporto di fase (raggio/2 x spessore di fase) pari a circa 250 e lunghezza non inferiore a 30 m.

Fase stazionaria	Nomi commerciali fase/colonna
Non polare metil silicene 5% fenile + 95% metilsilicene	SE-30, DB-1, SPB-1 o equivalenti SPB-5, PTE-5, SE-54, ULTRA-2 o equivalenti
Polare (non dichiarata) cianopropilsilicene stabilizzato	SPB-608 SP-2331 o equivalenti

5.5 *Evaporatore rotante*, con possibilità di operare con il vuoto, bagno termostatico e adatto sistema per il recupero dei solventi.

5.6 *Vetreteria*

5.6.1 Colonna in vetro per disidratazione su solfato di sodio anidro (lunghezza 10 cm; 3,5 cm d.i.) senza setto poroso, con gambo sfinato (10 mm d.i.). Il setto poroso è sostituito da un piccolo batuffolo di cotone sgrassato, opportunamente inserito nel punto di restringimento in fondo alla colonna. In alternativa si possono utilizzare le colonne per la disidratazione in accordo con le specifiche EPA (serbatoio per 60 mL di estratto, colonna di lunghezza 10 cm e 2 cm d.i., gambo sfinato 8 mm d.i., vedi Fig. 1).

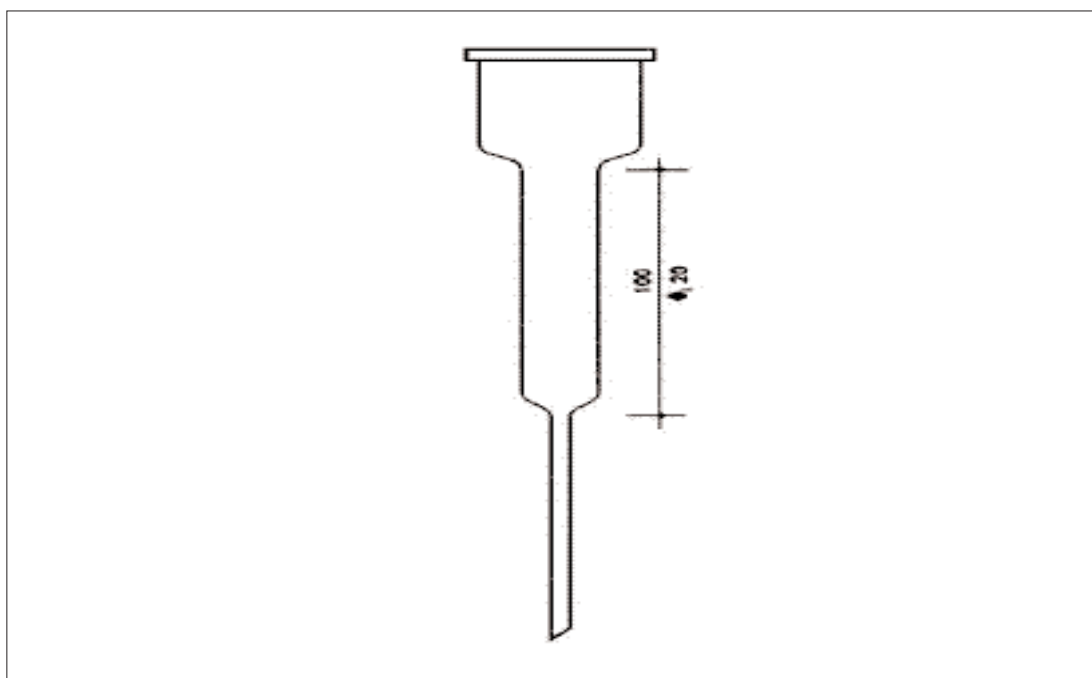


Figura 1: Colonna per disidratazione secondo le specifiche EPA (le misure sono espresse in mm).

5.6.2 Microcolonna in vetro (lunghezza 30 cm; 4,2 mm d.i.), con estremità superiore munita di smeriglio per il collegamento con un serbatoio per l'eluente, per la cromatografia su gel di silice disattivato (Fig. 2).

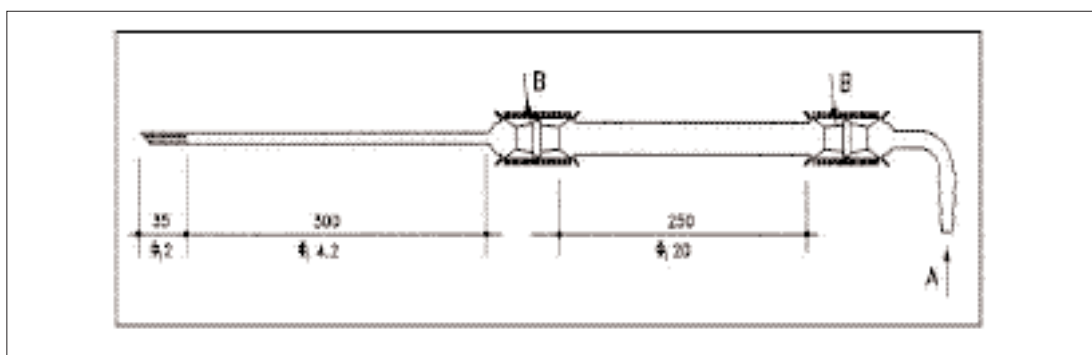


Figura 2: Microcolonna per la separazione di pesticidi ed altri composti in quattro gruppi. A, ingresso aria per ottenere una leggera pressione; B, giunto 10/19 (le misure sono espresse in mm).

5.6.3 Fiale o provette da concentrazione in vetro da 2 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL e 25 mL preferibilmente con gambo sfinato.

5.6.4 Imbuti separatori da 125 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, muniti di tappo a smeriglio e rubinetto in teflon.

5.6.5 Palloni (preferibilmente a cuore) con cono smeriglio adatto per l'evaporatore rotante, di cui al punto 5.5, aventi capacità 50 mL, 100 mL e 250 mL.

5.6.6 Matracci tarati con tappo smeriglio da 10 mL, 50 mL, 100 mL e 1000 mL.

5.6.7 Pipette tarate (volumi da 0,5 mL a 10 mL).

5.6.8 Altra vetreria normalmente in dotazione in qualsiasi laboratorio chimico (beute con tappo smeriglio, cilindri graduati, imbuti, pipette Pasteur).

5.7 *Microsiringhe per gascromatografia* (tipo Hamilton o equivalenti) aventi capacità di 5 μ L e 10 μ L.

5.8 *Microsiringhe per dosaggio di liquidi* (tipo Hamilton o equivalenti per HPLC) da 25 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 250 μ L e 500 μ L.

5.9 *Bilancia analitica*, risoluzione 0,1 mg.

6. Reattivi

Tutti i solventi, a meno che non siano specificatamente dichiarati "per analisi di pesticidi" vanno sottoposti a purificazione mediante distillazione con apparecchiature "tutto vetro". È consigliabile che per ogni solvente si disponga di una apposita apparecchiatura di distillazione. Tutti i solventi vanno comunque controllati prima di essere utilizzati, usando le quantità impiegate nella procedura, concentrando al volume finale indicato e controllando mediante analisi gas cromatografica. Analogamente, è sempre consigliato l'uso di reattivi specificatamente dichiarati per "analisi di pesticidi".

6.1 *n-Pentano "per analisi pesticidi"*

6.2 *n-Esano "per analisi pesticidi"*

6.3 *Diclorometano "per analisi pesticidi"*

6.4 *Acetonitrile "per analisi pesticidi"*

6.5 *Benzene "per analisi pesticidi"*

6.6 *Acqua distillata*, esente da sostanze organiche che possano interferire nelle analisi (esempio: ottenuta da acqua distillata trattata su sistemi dotati di apposita cartuccia in carbone attivo). L'acqua deve essere controllata con una prova di "bianco".

6.7 *Acido cloridrico concentrato*

6.8 *Solfato di sodio granulare anidro* trattato in muffola a 450°C per almeno 4 ore; conservare in recipiente di vetro ermeticamente chiuso.

6.9 *Soluzione satura di cloruro di sodio* in acqua distillata (trattato preventivamente in muffola a 450°C per almeno 4 ore e lasciato raffreddare) (6.6). È consigliabile eseguire un'e-

strazione con n-esano (50 mL per 500 mL di soluzione satura) per rimuovere eventuali impurezze residue.

6.9.1 Soluzione al 2% p/p di cloruro di sodio in acqua distillata (trattato preventivamente in muffola a 450°C per almeno 4 ore e lasciato raffreddare) (6.6). È consigliabile eseguire un' estrazione con n-esano (50 mL per 500 mL di soluzione) per rimuovere eventuali impurezze residue.

6.10 *Cotone sgrassato* in Soxhlet con n-esano/acetone 1:1 (v/v) per 6 ore e lasciato asciugare. Conservare in recipiente di vetro chiuso.

6.11 *Gel di silice*, tipo 950, 60-200 mesh, attivato in stufa ad aria a 200°C per 8 ore e conservato in beuta con tappo a smeriglio, posta in essiccatore in presenza di agenti essiccanti.

6.12 *Gel di silice*

Gel di silice (100-200 mesh) disattivato mediante aggiunta di acqua distillata (6.6) al 6,5% (p/p). La disattivazione è effettuata nel seguente modo: a 25 g di gel di silice (trattato a 200°C per 8 ore e conservato in beuta con tappo a smeriglio posta in essiccatore in presenza di agenti essiccanti) viene addizionata la giusta quantità di acqua distillata determinata in base ai risultati di prove di taratura dell'adsorbente condotte come descritto al Sottoparagrafo (7.3.3 B). L'aggiunta viene effettuata goccia a goccia in una beuta sotto costante agitazione. Agitare per 20 minuti e lasciare riposare una notte prima dell'uso. Conservare in recipiente ermeticamente chiuso, ma non in presenza di agenti essiccanti. Il gel così preparato conserva le sue caratteristiche per circa una settimana.

6.13 *Allumina basica* tipo 90 (attività II-III, 70-230 mesh) trattata a 250°C per 6 ore e conservata in beuta con tappo a smeriglio, posta in essiccatore in presenza di agenti essiccanti.

6.14 *Sodio solfito*, anidro, grado analitico.

6.15 *Sodio idrossido*, grado analitico.

6.16 *Lana di vetro silanizzata*

6.17 *Agente silanizzante*, soluzione al 10% di dimetildiclorosilano in toluene.

6.18 *Agente desolforante*

Sciogliere 9 g di solfito di sodio e 1 g di idrossido di sodio in un piccolo volume di acqua che viene poi estratta due volte con un piccolo volume di esano per rimuovere le eventuali sostanze organiche; aggiungere questa soluzione a 79 g di allumina basica e portare il peso finale a 100 g per essiccamento in modo da avere un contenuto finale di acqua pari all'11%.

6.19 *Soluzioni di riferimento di pesticidi*

I riferimenti dei pesticidi elencati in Tab. 1 debbono essere reperiti al più elevato grado di purezza (comunque >95%, considerando le eventuali correzioni da apportare ai calcoli per livelli di purezza inferiori al 98%). In generale è preferibile acquistare il principio attivo puro, piuttosto che sue soluzioni a concentrazione nota, essendo queste ultime generalmente meno stabili e più difficilmente conservabili a causa delle variazioni del volume di solvente. La purezza dei riferimenti deve essere controllata per via gascromatografica.

6.19.1 Soluzioni concentrate dei singoli pesticidi

Pesare circa 0,01 g di principio attivo puro e solubilizzarlo in n-esano portando a volume in un matraccio da 50 mL (concentrazione finale di circa 200 µg/mL). Le soluzioni devono essere conservate in frigorifero e le eventuali variazioni di volume del solvente possono essere controllate periodicamente per pesata. I pesticidi clororganici in genere restano inalterati per lunghi periodi (almeno 6 mesi).

6.19.2 Soluzioni diluite dei singoli pesticidi

Preparare dette soluzioni diluendo opportunamente le soluzioni concentrate (6.19.1) in modo da avere concentrazioni di circa 0,500 ng/µL, 0,100 ng/µL e 0,025 ng/µL.

6.19.3 Soluzioni di riferimento cumulative

In rapporto a particolari problemi delle varie fasi della procedura (purificazione e separazione, risoluzione gascromatografica) può essere utile preparare soluzioni di riferimento cumulative, diluendo opportunamente le soluzioni di cui ai Sottoparagrafi precedenti. È preferibile preparare soluzioni cumulative a concentrazioni differenziate, in rapporto alla risposta specifica del rilevatore utilizzato ai vari principi attivi.

6.19.4 Soluzioni di riferimento diluite per prove di recupero

Per le prove di recupero, ai fini del controllo dell'intero procedimento, si debbono utilizzare soluzioni preparate in un solvente miscibile con acqua. Preparare queste soluzioni seguendo le modalità riportate nei Sottoparagrafi precedenti, utilizzando acetone.

7. Procedimento

7.1 *Trattamento preliminare*

Se il campione è stato refrigerato, prima dell'estrazione farlo equilibrare a temperatura ambiente. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire la migliore omogeneità.

7.2 *Estrazione*

Trasferire 500 mL (od un volume minore) di campione in un imbuto separatore da 1 L, aggiungere 60 mL (ridurre a 20-30 mL se la quantità di campione prelevata è di 100 mL) di miscela di diclorometano/n-esano 15:85 (v/v) ed estrarre per 3 minuti con forte agitazione. Attendere la separazione tra le due fasi. Nel caso di formazione di emulsione, aggiungere una soluzione satura di cloruro di sodio (50-100 mL), agitare ed attendere; se la quantità di emulsione rimane comunque elevata (volume di emulsione pari ad un terzo della fase organica) centrifugare o filtrare su lana di vetro. Scaricare la fase acquosa (fase inferiore) in un secondo imbuto separatore e raccogliere la fase organica (fase superiore) per percolazione su sodio solfato anidro (circa 30 g) in un pallone da 250 mL. Ripetere l'estrazione con due successive aliquote di 60 mL di miscela diclorometano/n-esano 15:85 (v/v). Riunire le fasi organiche disidratate su sodio solfato anidro; lavare il sodio solfato con circa 20 mL di n-esano che vengono raccolti insieme alle altre fasi organiche. Concentrare a piccolo volume (circa 5 mL) mediante evaporatore rotante con bagno termostatico alla temperatura di 45°C e sotto vuoto moderato (400 mm Hg). Trasferire quantitativamente l'estratto in una provetta da concentrazione aiutandosi con circa 5 mL di esano per i lavaggi, aggiungere 1 mL di iso-ottano e concentrare sotto flusso di azoto a circa 2 mL per assicurare la completa eliminazione del diclorometano.

7.3 Purificazione

Di seguito sono descritte le tecniche di purificazione più idonee per l'eliminazione delle più probabili interferenze. L'analista dovrà decidere se sottoporre l'estratto ad una o più di una delle seguenti procedure. Si consiglia comunque di sottoporre sempre l'estratto alla ripartizione con acetonitrile.

7.3.1 Ripartizione con acetonitrile

Questa procedura è utilizzata per separare grassi ed oli dall'estratto.

Trasferire quantitativamente l'estratto in un imbuto separatore da 125 mL con un volume di n-esano sufficiente ad avere un volume finale nell'imbuto di 15 mL. Estrarre il campione per quattro volte con 30 mL di acetonitrile saturo di esano, agitando ogni volta vigorosamente per 1 minuto. Riunire le soluzioni di acetonitrile in un imbuto separatore da 1000 mL già contenente 700 mL di soluzione al 2% di NaCl. Miscelare ed estrarre con due aliquote successive di 100 mL di n-esano, agitando ogni volta.

Riunire gli estratti esanici in un imbuto separatore da 1000 mL e lavare con due porzioni successive di 100 mL di acqua distillata. Scartare le acque di lavaggio e disidratare l'esano su solfato di sodio anidro. Lavare l'imbuto separatore e il sodio solfato con tre porzioni di 10 mL di n-esano, riunendole all'estratto esanico. Concentrare in evaporatore rotante a volume noto (≤ 10 mL) ed analizzare in gascromatografia. Ridurre sotto flusso di azoto fino a 1 mL, se è necessario procedere alla purificazione successiva.

7.3.2 Rimozione dello zolfo elementare

È consigliabile adottare questa purificazione anche se si sospetta una interferenza molto lieve. Riempire una colonnina cromatografica (d.i. 7 mm) con 7 g di agente desolforante (6.18). Trasferire quantitativamente l'estratto concentrato nella colonnina ed eluire con 25 mL di esano. Concentrare in evaporatore rotante a volume noto (≤ 10 mL) ed analizzare in gascromatografia. Ridurre sotto flusso di azoto fino a 1 mL, se è necessario procedere alla purificazione successiva.

7.3.3 Cromatografia su gel di silice disattivato

La cromatografia su gel di silice viene effettuata per completare il procedimento di purificazione dell'estratto e per ottenere un frazionamento, anche se parziale, dei composti organoclorurati in due frazioni al fine di facilitare l'identificazione cromatografica. Lo schema generale di tale frazionamento è riportato in Tab. 2.

7.3.3.A Taratura dell'adsorbente

Prima di eseguire la cromatografia del campione, è indispensabile procedere alla taratura dell'adsorbente perché le caratteristiche possono variare ampiamente in relazione al tipo e al lotto di gel di silice. La taratura consiste nella definizione dei volumi di eluizione, utilizzando opportune soluzioni di riferimento dei pesticidi in esame, in modo da ottenere lo smistamento desiderato. I parametri indicati più avanti potranno dunque, dopo la fase di taratura dell'adsorbente, subire delle modifiche.

7.3.3.B Preparazione della colonna

Chiudere la parte inferiore della microcolonna (5.6.2) con un batuffolo di cotone sgrassato e versare nella colonna 2 g di gel di silice disattivato, in modo che la riempia fino ad una altezza di circa 20 cm (l'altezza è importante per la riproducibilità della separazione). Aggiungere un altro batuffolo di cotone sgrassato e uno strato di circa 1 cm di altezza di solfato di sodio anidro. Per il controllo dell'efficacia della colonna, senza prelevare il gel di silice aggiungere 1 mL di una soluzione di riferimento cumulativa (6.19.3), contenente i seguenti composti: aldrina, p,p'-DDT, p,p'-DDD e lindano.

Tabella 2: Schema generale di frazionamento dei pesticidi organoclorurati per cromatografia su gel di silice

	Eluato A (n-esano)	Eluato B (benzene/n-esano)
esaclorobenzene (HCB)	****	
(pentaclorobenzene)	****	
aldrina	****	
p,p'-DDE	****	
eptacloro	****	
o,p'-DDE	****	
o,p'-DDT	****	
p,p'-DDT	****	
pertane	****	
α-clordano	***	*
γ-clordano	***	*
o,p'-DDD	**	
p,p'-DDD	**	**
α-HCH	**	
β-HCH		****
γ-HCH (lindano)		****
δ-HCH		****
dicofol		****
eptacloro epossido		****
α-endosulfan		****
endrina		****
dieldrina		****
β-endosulfan		****

Nota 1: per i composti che non sono eluiti in una singola frazione (****=100%), si deve considerare ***60-95%; **30-60%; *5-30%.

Nota 2: i parametri di evaporazione (temperatura e vuoto) sono critici per ottenere recuperi soddisfacenti, poichè per codistillazione il recupero può scendere sotto il 50%.

Ciascun principio attivo dovrebbe essere ad una concentrazione di circa 0,1 ng/µL. Dopo adsorbimento, aggiungere 1 mL di esano (questa quantità serve per simulare il lavaggio del contenitore del campione). Dopo adsorbimento del solvente connettere il serbatoio alla colonna e quindi eluire, nell'ordine, con le seguenti miscele, cambiando il recipiente di raccolta quando il livello di un eluente raggiunge lo strato superiore del gel di silice:

- n-esano: 26 mL. Questa frazione deve contenere aldrina, p,p'-DDT e circa il 50% del p,p'-DDD;
- benzene/esano (60:40): 15 mL. Questa frazione deve contenere il residuo p,p'-DDD ed il lindano.

Il flusso degli eluenti deve essere di circa 1-2 mL/min e può essere ottenuto applicando una lieve pressione in testa alla colonna. Le due frazioni vengono concentrate con l'evaporatore rotante e sotto leggero vuoto, portate a volume noto con n-esano (<10 mL) ed analizzate in gascromatografia. Per l'eluizione del metossicloro e del captano occorre eluire con successivi 10 mL di benzene (frazione C).

È indispensabile che la taratura dell'adsorbente sia effettuata nel laboratorio dove normalmente vengono effettuate le analisi; la riproducibilità della separazione dipende infatti oltre che dall'attività dell'adsorbente e dalla purezza dei solventi, anche dalla temperatura e dall'umidità.

7.3.3.C Cromatografia del campione

Prima di procedere alla cromatografia, nel caso di campioni molto contaminati, l'estratto va

opportunamente diluito e la cromatografia su colonna effettuata su un'aliquota dello stesso. Usando la stessa tecnica utilizzata per la standardizzazione dell'adsorbente e nelle condizioni di disattivazione prima identificate, introdurre la soluzione del campione concentrato ad 1 mL nella microcolonna e far adsorbire. Quindi con 1 mL di esano lavare il contenitore del campione e introdurlo nella microcolonna. Eluire con i volumi più opportuni di n-esano e n-esano/benzene determinati nelle prove di taratura dell'adsorbente. Raccogliere separatamente le due frazioni e procedere secondo le modalità descritte per la standardizzazione dell'adsorbente. Eseguire l'analisi gascromatografica delle due frazioni per la determinazione dei pesticidi.

7.3.4 Cromatografia su gel di silice attivato

La prima frazione esanica proveniente dalla cromatografia su gel di silice disattivato può essere sottoposta a cromatografia su gel di silice attivato quando l'analisi gascromatografica mette in evidenza la presenza dei PCB oltre ai pesticidi clorurati.

Questa tecnica, sviluppata da Snyder e Reinert e modificata da Leoni, permette la separazione dei PCB dal DDT e DDE.

7.3.4.A Taratura dell'adsorbente

Nella colonna cromatografica, chiusa nella parte inferiore sfinata con un batuffolo di lana di quarzo, immettere 4 g di gel di silice attivato ricoprendoli quindi con n-pentano; chiudere con tappo a smeriglio e rovesciare più volte la colonna facendo infine depositare uniformemente l'adsorbente. Far percolare il solvente fino a circa 1 cm dal livello superiore dell'adsorbente e mettere nella colonna 1 mL di una soluzione in pentano di PCB e p,p'-DDE entrambi alla concentrazione di 5 µg/mL. Eluire la colonna nell'ordine con 140 mL di n-pentano e successivamente con 60 ml di benzene.

Concentrare i due eluati a un volume opportuno: all'analisi cromatografica i PCB e il p,p'-DDE si devono rinvenire rispettivamente negli eluati A e B.

Si richiama l'attenzione sul fatto che una buona preparazione della colonna è essenziale per la riproducibilità della separazione, in particolare deve essere evitata la formazione di bolle d'aria. L'efficienza della separazione è normalmente superiore al 90-95%. Se non si ottengono tali livelli di efficienza variare i volumi degli eluenti.

7.3.4.B Analisi del campione

Evaporare la soluzione in n-esano del campione, che contiene i pesticidi cloro-organici e i policlorodifenili (cioè proveniente dal primo gruppo di eluizione del gel di silice disattivato) fino a secchezza. Riprendere il residuo con un piccolo volume di n-pentano (2-3 mL) e quindi eseguire una cromatografia su gel di silice attivato nelle condizioni descritte in precedenza al punto A).

Nella prima frazione si possono rinvenire i pesticidi HCB, aldrina, eptacloro ed i PCB, mentre nella seconda frazione sono presenti i due isomeri del DDT e del DDE. I due eluati possono quindi essere analizzati con le tecniche gascromatografiche di seguito illustrate.

7.4 Determinazioni gascromatografiche

Si consiglia di utilizzare una colonna capillare con fase non polare ed un rivelatore a cattura di elettroni.

7.4.1 Caratteristiche cromatografiche delle colonne consigliate e relativi cromatogrammi

In Fig. 3 è riportato, a titolo di esempio, un cromatogramma di una soluzione di riferimento di pesticidi organoclorurati ottenuto con una delle colonne consigliate e le condizioni operative adottate. I tempi di ritenzione della maggior parte dei pesticidi di Tab. 1, ottenuti applicando le condizioni operative di Fig. 3, sono riportati in Tab. 3. Ovviamente, i dati riportati

sono indicativi e l'analista deve verificare i parametri con la strumentazione e le condizioni operative effettivamente utilizzate e inserire i tempi di ritenzione dei composti eventualmente mancanti sulla base dei riferimenti a disposizione.

Considerando l'elevato numero di composti organoclorurati presi in considerazione dal presente metodo e la variabilità delle prestazioni del rivelatore a cattura di elettroni si ritiene superfluo indicare i limiti di quantificazione per i singoli composti. D'altra parte, come già accennato, essi sono comunque abbondantemente sufficienti per il controllo delle acque di scarico in funzione dei limiti di legge esistenti. Per la verifica della riproducibilità della risposta del rivelatore, ripetere almeno tre volte l'iniezione di una sostanza di riferimento (esempio: aldrina).

7.4.2 Procedura per la taratura del rivelatore a cattura di elettroni

È necessario stabilire l'intervallo di linearità del rivelatore ed ottenere una curva di taratura per la verifica periodica della stabilità delle prestazioni del rivelatore e della stabilità delle soluzioni di lavoro. Per ogni composto da analizzare preparare soluzioni di lavoro ad almeno tre diverse concentrazioni. Le concentrazioni debbono essere tali che ad 1 µL di soluzione iniettata corrispondano quantità di pesticida comprese nell'intervallo 20-500 pg (questo è l'intervallo che può essere assunto preliminarmente come intervallo di linearità del rivelatore). Costruire una curva di taratura, riportando in diagramma il fattore di taratura (rapporto tra area del picco e massa iniettata) in funzione delle quantità iniettate.

Stabilire l'intervallo di linearità di risposta del rivelatore (intervallo di massa di composto iniet-

tato nel quale la curva ha un andamento parallelo all'asse delle ascisse). Per la verifica della stabilità delle condizioni gascromatografiche confermare quotidianamente l'andamento della curva di taratura con almeno una soluzione di riferimento diluita. Se la risposta varia da quella attesa più del 10%, il "test" deve essere ripetuto, utilizzando eventualmente soluzioni di riferimento diluite appena preparate. Altrimenti costruire una nuova curva di taratura. Scelte le condizioni operative, controllata la stabilità strumentale e la sensibilità del rivelatore a cattura di elettroni, passare all'analisi gascromatografica del campione estratto opportunamente concentrato, in modo che i picchi delle sostanze da analizzare entrino nell'intervallo di linearità. L'analisi qualitativa si basa sul confronto dei tempi di ritenzione, relativi ad una sostanza di riferimento, dei picchi presenti nei cromatogrammi del campione e delle soluzioni di riferimento, iniettati nelle stesse condizioni. La sostanza generalmente

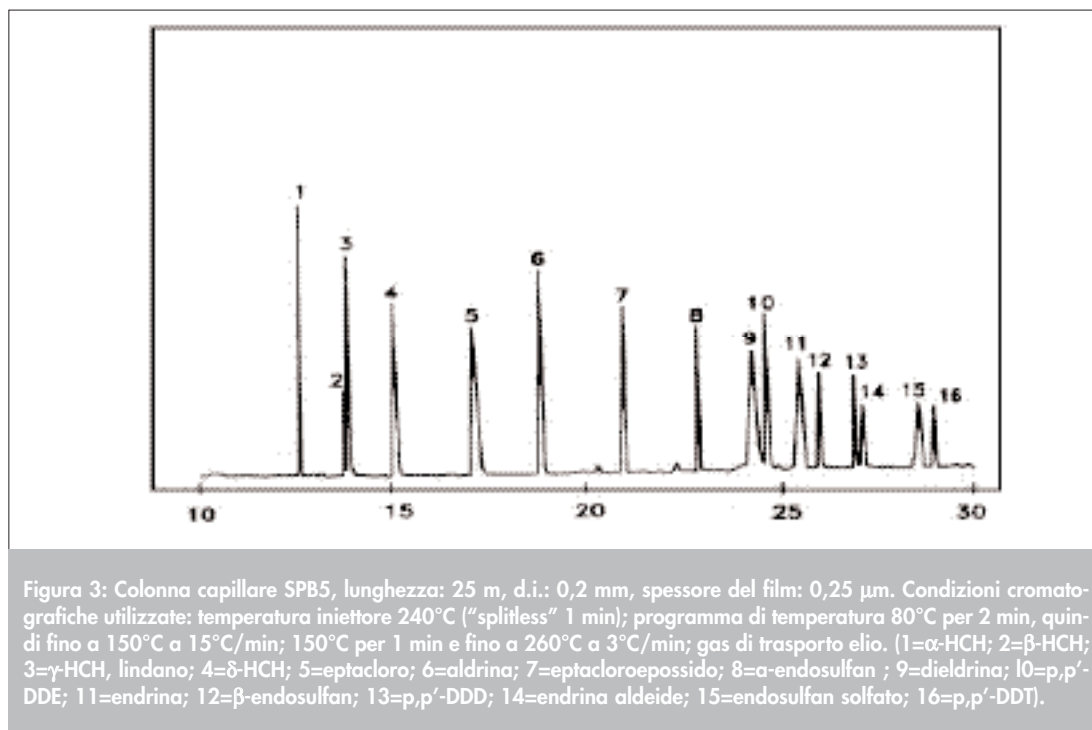
Tabella 3: Tempi di ritenzione relativi (RRT) all'aldrina di alcuni pesticidi clorurati

Composto	RRT
esaclorobenzene	
α-HCH	0,67
lindano	0,74
β-HCH	0,73
eptacloro	0,91
δ-HCH	0,80
aldrina	1,00 (18,76 minuti)
eptacloro epossido	1,11
δ-clordano	
o,p'-DDE	1,21
γ-clordano	
p,p'-DDE	1,30
dieldrina	1,29
o,p'-DDD	1,32
endrina	1,35
o,p'-DDT	1,42
p,p'-DDD	1,42
p,p'-DDT	1,54

presa come riferimento è l'Aldrina. Soluzioni di riferimento e campione devono essere preparate nello stesso solvente. Se la complessità del cromatogramma del campione (elevato rumore di fondo e/o presenza di numerosi picchi e/o bande) non permette alcuna identificazione, adottare le opportune tecniche di eliminazione delle possibili sostanze interferenti.

Per l'analisi quantitativa procedere nel modo seguente.

Iniettare 1 µL di esano per verificare che non vi siano picchi dovuti a residui dalle precedenti iniezioni. Iniettare le soluzioni di riferimento relative ai composti identificati nel campione. La concentrazione del riferimento deve essere dello stesso ordine di grandezza di quella del composto nel campione. Iniettare, quindi, il campione e confrontare l'area relativa al singolo composto nel cromatogramma del campione con quella relativa allo stesso composto nel cromatogramma delle soluzioni di riferimento.



7.5 Analisi di conferma

7.5.1 Analisi gascromatografica su colonna a diversa polarità

Qualora siano stati identificati nel campione uno o più pesticidi clorurati dell'elenco di Tab. 1, è opportuno procedere ad un'analisi di conferma utilizzando una colonna con polarità diversa da quella utilizzata per l'analisi. Poichè nel metodo è stato suggerito l'uso di una colonna capillare con fase non polare (tipo SE-54), si può ripetere l'analisi per la conferma della identità dei picchi, utilizzando una delle colonne indicate nello schema del punto 5.4 come colonne capillari a media od alta polarità. Poichè sulla colonna di conferma l'ordine di eluizione è differente, si debbono controllare i tempi di ritenzione relativi ai picchi dei pesticidi clorurati identificati con la prima colonna e se, iniettando standard e campione sulla colonna di conferma, i picchi vengono confermati, si ritiene l'identificazione soddisfacente.

7.5.2 - Analisi gascromatografica con rivelatore di massa (GC/MS)

Il rivelatore di massa (GC/MS), costituisce un utilissimo mezzo di identificazione perchè la sua risposta è in relazione al peso molecolare ed alla struttura del composto. Per i dettagli di questa tecnica analitica si rimanda al metodo 5110.

8. Calcoli

Il calcolo della concentrazione di un generico pesticida organoclorurato "i", nel campione di acqua in esame si effettua applicando la seguente formula:

$$C_i = \frac{S \cdot A_c \cdot V_f}{A_i \cdot V_i \cdot V_e}$$

dove:

C_i = concentrazione (µg/L) del pesticida "i" identificato nel campione;

S = quantità (ng) di riferimento iniettato;

A_c = area del picco relativo al pesticida "i" nel campione*;
 V_f = volume finale (μL) dell'estratto;
 A_s = area del picco relativo al pesticida "i" nel riferimento*;
 V_i = volume (μL) di estratto iniettato;
 V_c = volume (mL) di campione sottoposto all'analisi (mL).

9. Qualità del dato

Prove di recupero effettuate utilizzando il metodo descritto hanno fornito, per l'intera procedura, recuperi superiori all'85% per tutti i composti organoclorurati presi in esame, con la sola eccezione dell'aldrina (recupero medio $79\% \pm 6,7\%$, su 5 prove). Per quanto riguarda alcuni composti (esempio esaclorobenzene ed HCH) l'utilizzazione di condizioni drastiche (vuoto spinto e temperatura $>45^\circ\text{C}$) nelle fasi di concentrazione del campione possono portare a recuperi non soddisfacenti.

Nota: si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico". Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

AHNOFF M. & JOSEFSSON B. (1975): "Cleanup procedures for PCB analysis on river extracts", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **13**, 159.

ARMOUR J.A. & BURKE J.A. (1970): "Method for separating polychlorobiphenyls from DDT and its analogs", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **53**, 761.

BIDLEMAN T.F., MATTEWS J.R. & OLNEY C.E. (1978): "Separation of polychlorinated biphenyls, chlordane and p,p'-DDT from toxaphene by silicic acid column chromatography", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61**, 820.

BLUMER M. (1957): "Removal of elemental sulfur from hydrocarbon fractions", *Anal. Chem.*, **29**, 1039.

Decreto Legislativo 152/99, Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole, *G.U. n. 124, 29 maggio 1999, Supplemento Ordinario n. 101/L*.

ERNEY D.R. (1974): "Silica gel microcolumns for the separation of some polychlorinated biphenyls, DDT, and analogs", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **12**, 542.

GOERLITZ D.F. & LAW L.M. (1971): "Note on removal of sulfur interferences from sediment extracts for pesticide analysis", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **6**, 9.

*le aree saranno espresse in unità di misura convenzionali fornite dall'integratore.

HERNANDEZ HERNANDEZ F., LOPEZ BENET F.J., MEDINA ESCRICHE J. & BARBERA UBEDA J.C. (1987): "Sulfuric acid cleanup and KOH-Ethanol treatment for confirmation of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls: application to wastewater samples", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 727.

LEONI V. (1971): "The separation of fifty pesticides and related compounds and polychlorobiphenyls into four groups by silica gel microcolumn chromatography", *J. Chromatogr.*, **62**, 63.

JAPENGA J., WAGENAAR W.J., SMEDES F. & SALOMONS W. (1987): "A new, rapid clean-up procedure for the simultaneous determination of different groups of organic micropollutants in sediments; application in two European estuarine sediment studies", *Environ. Technol. Lett.*, **8**, 9.

JENSEN S., RENBERG L. & REUTERGARDH L. (1977): "Residue analysis of sediment and sewage sludge for organochlorines in the presence of elemental sulfur", *Anal. Chem.*, **49**, 316.

LAWRENCE J., TOSINE H.M. & HELLE M. (1977): "Polychlorinated biphenyl concentrations in sewage and sludges of some waste treatment plants in southern Ontario", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **17**, 49.

LEONI V., CREMISINI C., CASUCCIO A. & GULLOTTI A. (1991): "The separation of pesticides and related compounds, polychlorobiphenyls and other pollutants into four groups by silica gel microcolumn chromatography (Application to surface water analysis)", *Pestic. Sci.*, **31**, 209-220.

REYNOLDS L.M. & COOPER T. (1975): "Analysis of organochlorine residues in fish, *Water Quality Parameters*", ASTM STP 573, American Society for Testing and Materials, Philadelphia.

SCHUTZMANN R.L., WOODHAM D.W. & COLLIER C.W. (1971): "Removal of sulfur in environmental samples prior to gas chromatographic analysis for pesticide residues", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **54**, 1117.

SNYDER D. & REINERT R. (1971): "Rapid separation of polychlorinated biphenyls from DDT and its analogues on silica gel", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **6**, 385.

TEICHMAN J., BEVENUE A. & HYLIN J.W. (1978): "Separation of polychlorobiphenyls from chlorinated pesticides in sediment and oyster samples for analysis by gas chromatography", *J. Chromatogr.*, **151**, 155.

TELLING C.M., SISSON D.J. & BRINKMAN M.W. (1977): "Determination of organochlorine insecticide residues in fatty foodstuff using a clean-up technique based on a single column of activated alumina", *J. Chromatogr.*, **137**, 405.

THOMPSON J.F., (1977). "Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples", revision, U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, N.C.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA): "Method 617: The Determination of Organohalide Pesticides and PCBs in Municipal and Industrial Wastewater".

ZITKO V. (1971): "Effects of pesticides-grade hexanes on the silicic acid chromatography of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides", *J. Chromatogr.*, **59**, 144.

5100. Pesticidi fosforati

I pesticidi fosforati sono una classe di pesticidi caratterizzati dalla presenza di un gruppo fosforico nella molecola variamente sostituito (alchil e/o aril fosfati, pirofosfati, tiofosfati e ditiofosfati). Sono composti facilmente degradabili, soprattutto per via idrolitica. Nonostante ciò non si possono escludere per alcuni di loro fenomeni di persistenza nell'ambiente. Infatti esteri fosforici e loro derivati sono stati ripetutamente identificati anche nelle acque superficiali sia in Italia che in altri paesi. Caratteristiche quali solubilità e persistenza possono variare notevolmente tra i composti appartenenti a questa classe.

Il metodo descritto riguarda la determinazione in acque di scarico di pesticidi organofosforici di largo impiego e può anche essere esteso ad alcuni dei loro prodotti di degradazione nonché ad altri prodotti strutturalmente correlati non impiegati come pesticidi.

La necessità di un unico metodo per più principi attivi ha portato alla scelta di condizioni operative soddisfacenti per tutti i composti presi in considerazione, pur se per i singoli composti possono esistere alternative procedurali più efficienti. Qualora si conosca in anticipo il composto da determinare si può quindi adottare un metodo di riferimento, se disponibile in letteratura.

Le concentrazioni massime ammesse nelle acque dalla normativa vigente condizionano, in relazione al limite di quantificazione del metodo, il volume di campione da sottoporre ad analisi ed anche il volume finale a cui concentrare l'estratto. Per le acque di scarico, il limite di legge posto a 0,1 mg/L (Tab. 3, All. 5 del D.Lgs. 152/99) consentirebbe di eseguire l'analisi su piccoli volumi di campione (pochi millilitri); d'altra parte l'esigenza di un campione rappresentativo suggerisce di operare comunque su volumi maggiori.

Informazioni preliminari sui livelli dei composti nel campione, riferite eventualmente a precedenti analisi nello stesso sito di campionamento, possono aiutare nel determinare la quantità di campione da sottoporre all'analisi e il volume finale al quale l'estratto deve essere concentrato. Allo scopo di determinare concentrazioni dell'ordine dei $\mu\text{g/L}$ si consiglia di utilizzare 100-500 mL di campione di acqua.

Ulteriori considerazioni possono essere fatte per quanto concerne la necessità di operare tecniche di purificazione dell'estratto in funzione delle impurezze presenti nel campione. Ovviamente nei campioni di acque di scarico sono potenzialmente presenti molte impurezze e possono essere necessarie tecniche specifiche di purificazione. Nel metodo vengono suggerite tecniche di purificazione dell'estratto in funzione delle eventuali interferenze presenti nel campione. Sono descritte tecniche di ripartizione n-esano/acetone, cromatografia su colonna di allumina, cromatografia e frazionamento su colonna di gel di silice.

In ogni caso, per ridurre la possibilità di errore, l'applicazione dei procedimenti descritti richiede personale lungamente addestrato a questo tipo di determinazioni e l'effettuazione di frequenti controlli di qualità. Nel metodo sono descritte tecniche di conferma basate sul preliminare frazionamento su gel di silice e sull'uso di differenti condizioni gascromatografiche (colonne a diversa polarità e diversi rivelatori). In particolare per le analisi di conferma è consigliato l'uso, se disponibile in laboratorio, di un rivelatore di massa.

1. Principio del metodo

Il metodo presenta alcune alternative procedurali, che l'analista può scegliere in rapporto al tipo e quantità delle interferenze e alla presenza di uno o più pesticidi organofosforici nel campione.

In particolare il metodo consiste in una estrazione liquido-liquido con diclorometano, con-

centrazione dell'estratto organico ed analisi gascromatografica. In caso di presenza di sostanze interferenti si può procedere ad una purificazione dell'estratto mediante ripartizione n-esano/acetone e/o una cromatografia su opportuno adsorbente (allumina o gel di silice). Non è stata presa in considerazione la tecnica di estrazione solido-liquido, pure se molto utilizzata ed in grado di fornire ottimi risultati. Tale scelta è stata motivata dal fatto che le analisi per le acque di scarico debbono essere eseguite sul campione tal quale, senza filtrazione preliminare. La presenza di particolato in sospensione può ridurre l'efficienza estrattiva dei materiali solitamente utilizzati ed, in alcuni casi, può dar luogo a recuperi non soddisfacenti. L'operatore può comunque stabilire, caso per caso, se esistono i presupposti per una corretta utilizzazione di tale tecnica.

La determinazione gascromatografica è realizzata mediante un rivelatore fotometrico a fiamma selettivo per il fosforo, che praticamente elimina tutte le interferenze, non contenenti fosforo, eventualmente presenti. Questo rivelatore è identificato dalla sigla FPD (Flame Photometric Detector).

L'uso di un rivelatore a ionizzazione di fiamma modificato con sali di metalli alcalini, selettivo verso il fosforo e l'azoto, può essere utile. Infatti questo rivelatore generalmente consente di raggiungere limiti inferiori di determinazione rispetto all'FPD ed inoltre il confronto delle risposte dei due rivelatori, pur richiedendo un difficile lavoro di taratura da effettuare ogni volta prima dell'analisi, potrebbe fornire utili informazioni per la conferma dell'identità del composto. Il rivelatore a ionizzazione di fiamma, comunemente detto azoto/fosforo è identificato dalla sigla NPD (Nitrogen Phosphorus Detector) o TSD (Thermionic Specific Detector).

Si sconsiglia l'uso del rivelatore a cattura di elettroni (ECD) per la sua scarsa selettività, e per l'intervallo di linearità ridotto.

La disponibilità di un rivelatore di massa (MS), operante in SIM (Single Ion Monitoring) permette un'ulteriore più sicura identificazione della sostanza.

Per quanto riguarda le colonne gascromatografiche, si consiglia l'uso di colonne con fase stazionaria non polare e a polarità intermedia. Nel metodo vengono suggerite alcune possibilità di scelta tra le colonne commercialmente disponibili e di uso più frequente. L'analisi qualitativa si basa sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi osservati nel campione con quelli di idonee miscele di riferimento. L'uso di colonne con fase stazionaria a diversa polarità è utile per la conferma qualitativa dei composti.

L'analisi quantitativa è realizzata per confronto delle aree dei picchi dei campioni con quelli ottenuti da soluzioni di riferimento. I risultati sono di norma espressi in microgrammi per litro ($\mu\text{g/L}$).

2. Campo di applicazione

Con il presente metodo, utilizzando le tecniche di estrazione e concentrazione dell'estratto di seguito indicate, possono essere determinati pesticidi organofosforici e loro metaboliti presenti nel campione a livello di pochi microgrammi per litro (per la maggior parte dei composti il limite di quantificazione è $\leq 1 \mu\text{g/L}$). Questo limite di quantificazione è ampiamente adeguato alla normativa vigente (Tab. 3, All. 5 del D.Lgs. 152/99), che stabilisce un limite di $0,1 \text{ mg/L}$ per le acque di scarico.

Concentrazioni inferiori al $\mu\text{g/L}$, fino a 1 ng/L , possono essere dosate variando opportunamente il volume di acqua da estrarre, il volume finale dell'estratto ed il volume dell'estratto iniettato nel gascromatografo.

Il procedimento è applicabile ai principali pesticidi organofosforici oggi utilizzati in Italia (Tab. 1). Esso può essere esteso, previa sperimentazione, ad altri principi e loro metaboliti.

Tabella 1: Pesticidi fosforati

Composti	Composti
Azinfos-etile	Etion
Azinfos-metile	Fenitrothion
Bromofos	Fosalone
Clorfenvinfos E	Malaoxon
Clorfenvinfos Z	Malation
Clorpirifos	Metidation
Clorpirifos-metile	Paraoxon
Demeton-O	Paraoxon-metile
Demeton-S-metile	Paration
Demeton-S-metil solfone	Paration-metile
Diazinone	Pirimifos-metile
Dimetoato	Tetraclorvinfos
Eptenofos	Vamidotion

3. Interferenze e cause di errore

Solventi e reagenti, vetreria, l'eventuale contaminazione dell'ambiente di lavoro ed ogni trattamento del campione possono causare problemi e portare alla presenza di picchi interferenti nei cromatogrammi e/o alterazioni della corrente di fondo dei rivelatori con conseguenti difficoltà di interpretazione e/o interpretazioni errate del tracciato gascromatografico. Tutti i materiali utilizzati pertanto devono essere esenti da interferenze nelle condizioni operative adottate. È quindi buona norma di laboratorio, all'inizio dell'indagine e periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi" sostituendo al campione acqua distillata. Nel caso di presenza di interferenze, individuarne la provenienza, analizzando ogni singolo passaggio della procedura e procedere alla loro eliminazione. Può essere richiesta una specifica selezione dei reattivi ed una purificazione dei solventi per mezzo di distillazione.

Le interferenze presenti negli effluenti industriali sono spesso non trascurabili e di varia natura e possono causare difficoltà nell'ottenere misure precise ed accurate. Quando, nel caso di analisi gascromatografica diretta dell'estratto organico del campione, l'ammontare complessivo delle sostanze interferenti supera le caratteristiche di specificità proprie dei rivelatori, è necessario procedere alla purificazione dell'estratto, tenendo presente che questa fase può implicare perdite di alcuni pesticidi organofosforici. Non essendo possibile indicare tutte le procedure per eliminare ogni possibile sostanza interferente presente nelle acque reflue, sono indicate qui alcune tra le più efficienti. Ovviamente, per quanto sopra accennato, la tecnica di purificazione deve essere verificata di volta in volta su soluzioni di riferimento dei singoli composti, per accertare che non si verifichino perdite significative dell'analita.

Pesticidi organoclorurati, policlorobifenili e ftalati, che rappresentano classiche interferenze nella determinazione dei pesticidi organofosforici quando si usa un rivelatore a cattura di elettroni, sono praticamente eliminate dall'uso del rivelatore FPD.

4. Campionamento e conservazione del campione

I campioni vanno prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, della capacità di 1 litro con chiusura a smeriglio oppure a vite. Prima del riempimento le bottiglie devono essere risciacquate con la stessa acqua che si desidera campionare. È consigliabile evitare l'uso di qualsiasi dispositivo in plastica. È buona norma prelevare due aliquote per ciascun campione. I campioni dovrebbero essere analizzati quanto prima possibile perché gli esteri fosforici possono non essere stabili in soluzione acquosa, soprattutto se alcalina. Aggiungere al campione acido solforico concentrato (1:1) o idrossido di sodio 1 M fino a pH 6,5-7,5 (eventualmente portare a pH 7 con 50 mL di tampone fosfato (6.13) e conservare in frigorifero per

non più di due giorni. Se nel campione è sospettata la presenza di diazinone, l'estrazione va eseguita immediatamente a causa della elevata instabilità del composto in acqua.

Se è necessario conservare il campione per un lungo periodo, al fine di bloccare qualsiasi eventuale attività biologica, al campione possono essere aggiunte sostanze battericide qualora sia stata preventivamente accertata la loro efficacia e la loro non interferenza con l'analisi. Per maggiori dettagli sul campionamento si può fare riferimento alla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

5. Apparecchiature

5.1 *Gas Cromatografo* che consenta l'impiego di colonne capillari.

5.2 *Rivelatori*

Fotometrico a fiamma (FPD) con filtro per il fosforo ($\lambda=526$ nm) e per lo zolfo ($\lambda=394$ nm). È consigliabile inoltre l'uso di un rivelatore azoto/fosforo (NPD) e, se disponibile, può essere molto utile un rivelatore di massa (MS) operante in SIM soprattutto per le analisi di conferma.

5.3 *Sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati cromatografici*

5.4 *Colonne gascromatografiche*

Le colonne e le fasi stazionarie consigliate per l'analisi dei pesticidi organofosforati sono descritte nello schema seguente. Si consiglia di utilizzare colonne con rapporto di fase (raggio/2 x spessore di fase) di circa 250 e di lunghezza non inferiore a 30 m.

Per prove di conferma è utile disporre di colonne con fase stazionaria a diversa polarità.

Fase stazionaria	Nomi commerciali fase/colonna
Non polare metil silicone 5%fenile + 95%metil silicone	SE-30, DB-1 <i>od equivalenti</i> SPB-5, DB-5, SE-54, ULTRA-2 <i>o equivalenti</i>
Media polarità 14% cianopropilfenil silicone 50% fenile + 50% metil silicone	OV-1701, SPB-1701, DB 1701 <i>o equivalenti</i> OV-17, SP-2250, DB-17 <i>o equivalenti</i>

5.5 *Evaporatore rotante* con possibilità di operare con il vuoto, con bagno termostatico e adatto sistema per il recupero dei solventi.

5.6 *Vetreria*

5.6.1 Colonna in vetro per disidratazione su solfato di sodio anidro (lunghezza 10 cm; 3,5 cm d.i.) senza setto poroso, con gambo sfinato (10 mm d.i.). Il setto poroso è sostituito da un piccolo batuffolo di cotone sgrassato, opportunamente inserito nel punto di restringimento in fondo alla colonna. In alternativa si possono utilizzare le colonne per la disidratazione in accordo con le specifiche EPA (serbatoio per 60 mL di estratto, colonna 10 cm x 2 cm d.i., gambo sfinato 8 mm d.i., vedi Fig. 1).

5.6.2 Microcolonna in vetro 30 cm x 4,2 mm d.i. (con estremità superiore munita di smeriglio per il collegamento con un serbatoio per l'eluente), per la cromatografia su gel di silice (Fig. 2).

5.6.3 Fiale o provette (preferibilmente con gambo sfinato) da concentrazione in vetro da 2 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL e 25 mL.

5.6.4 Imbuti separatori da 125 mL, 500 mL e 1000 mL, muniti di tappo a smeriglio e rubinetto in teflon.

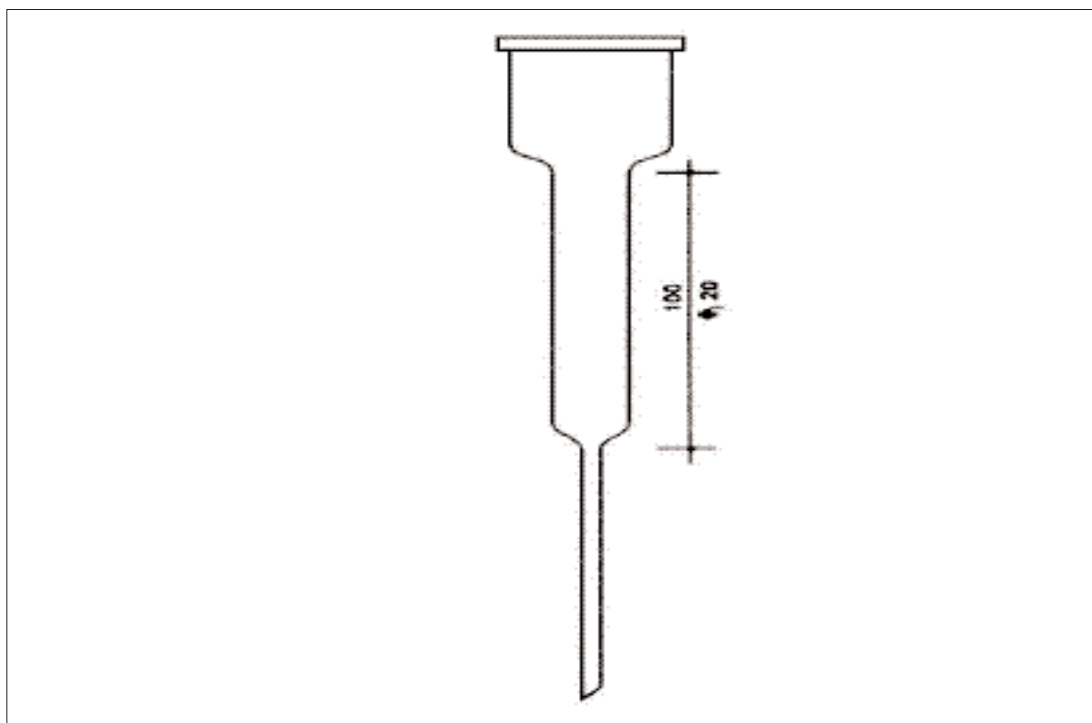


Figura 1: Colonna per disidratazione secondo le specifiche EPA (le misure sono espresse in mm).

5.6.5 Palloni (preferibilmente a cuore) con cono smeriglio adatto per l'evaporatore rotante, di cui al punto 5.5, aventi capacità 50 mL, 100 mL e 250 mL.

5.6.6 Matracci tarati con tappo smeriglio da 10 mL, 100 mL e 1000 mL.

5.6.7 Pipette tarate (volumi da 0,5 mL a 10 mL).

5.6.8 Altra vetreria normalmente in dotazione in qualsiasi laboratorio chimico (beute con tappo smeriglio, cilindri graduati, imbuto, pipette Pasteur).

5.7 *Microsiringhe per gascromatografia* (tipo Hamilton o equivalenti) aventi capacità di 5 μL e 10 μL .

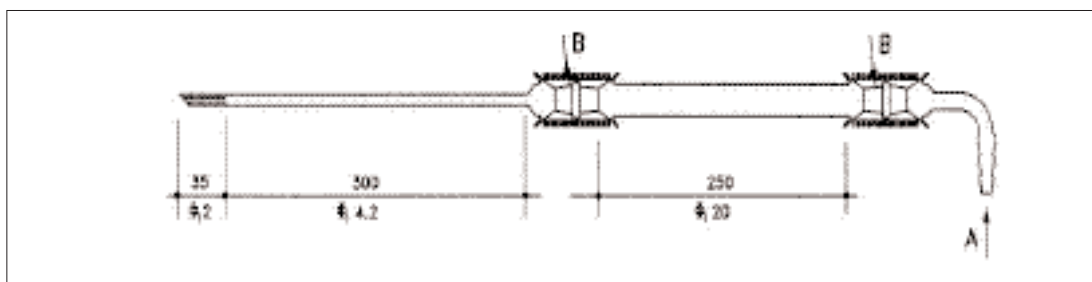


Figura 2: Microcolonna per la separazione di pesticidi ed altri composti in quattro gruppi. A, ingresso aria per ottenere una leggera pressione; B, giunto 10/19 (le misure sono espresse in mm).

5.8 *Microsiringhe per dosaggio di liquidi* (tipo Hamilton o equivalenti per HPLC) da 25 μL , 50 μL , 100 μL , 250 μL e 500 μL .

5.9 *Bilancia analitica*, risoluzione 0,1 mg.

6. Reattivi

Tutti i solventi, a meno che non siano specificatamente dichiarati "per analisi di pesticidi" vanno sottoposti a purificazione mediante distillazione con apparecchiature "tutto vetro". È consigliabile che per ogni solvente si disponga di una apposita apparecchiatura di distillazione. Tutti i solventi vanno comunque controllati prima di essere utilizzati, usando le quantità impiegate nella procedura e concentrando al volume finale indicato in procedura. Analogamente è sempre consigliato l'uso di reattivi specificatamente dichiarati per "analisi di pesticidi".

6.1 *n-Esano "per analisi pesticidi"*

6.2 *Diclorometano "per analisi pesticidi"*

6.3 *Acetonitrile "per analisi pesticidi"*

6.4 *Benzene "per analisi pesticidi"*

6.5 *Acetato di etile "per analisi pesticidi"*

6.6 *Alcool metilico "per analisi pesticidi"*

6.7 *Acetone "per analisi pesticidi"*

6.8 *Acqua distillata*

Esente da sostanze organiche che possano interferire nelle analisi (esempio: acqua distillata trattata su sistemi dotati di apposita cartuccia in carbone attivo). L'acqua deve essere controllata con una prova di "bianco".

6.9 *Soluzione di idrossido di sodio 1 M*

Pesare 40 g di idrossido di sodio e scioglierli in acqua distillata (6.8), portando a volume con acqua distillata in matraccio tarato da 1 L.

6.10 *Soluzione di acido solforico concentrato 1:1 (v/v), in acqua distillata (6.8)*

6.11 *Solfato di sodio granulare anidro trattato in muffola a 450°C per almeno 4 ore; conservare in recipiente di vetro ermeticamente chiuso.*

6.12 *Soluzione satura di cloruro di sodio (trattato preventivamente in muffola a 450°C per almeno 4 ore e lasciato raffreddare) in acqua distillata (6.8).*

6.13 *Soluzione tampone fosfato (pH=7)*

Preparare la soluzione mescolando 29,6 mL di HCl 0,1 M e 50 mL di K₂HPO₄ 0,1 M.

6.14 *Cotone sgrassato in Soxhlet con n-esano/acetone 1:1 (v/v) per 6 ore e lasciato asciugare. Conservare in recipiente di vetro chiuso.*

6.15 *Allumina neutra grado I, attivata a 130°C per 2 ore e, dopo raffreddamento, disattivata con acqua distillata al 5% (p/p).*

La disattivazione è effettuata trasferendo 1 mL di acqua distillata in una beuta da 125 mL con tappo a smeriglio e distribuendo l'acqua sulle pareti, ruotando la beuta. Aggiungere immediatamente 19 g di allumina ed agitare la beuta per almeno 20 minuti.

6.16 *Gel di silice* (100/200 mesh), disattivato mediante aggiunta di acqua distillata (6.8) al 6,5% (p/p).

La disattivazione è effettuata nel seguente modo: a 25 g di gel di silice (trattato a 200°C per 8 ore e conservato in beuta con tappo a smeriglio posta in essiccatore in presenza di agenti essiccanti) contenuti in una beuta, aggiungere la giusta quantità di acqua distillata determinata in base ai risultati di prove di taratura dell'adsorbente condotte come descritto nel Sottoparagrafo 7.3.3 A. L'aggiunta viene effettuata goccia a goccia sotto costante agitazione. Agitare poi per 20 minuti e lasciare riposare una notte prima dell'uso. Conservare in recipiente ermeticamente chiuso, ma non in presenza di agenti essiccanti. Il gel così preparato conserva le sue caratteristiche per circa una settimana.

6.17 *Lana di vetro silanizzata*

6.18 *Agente silanizzante*

Soluzione al 10% di dimetildiclorosilano in toluene.

6.19 *Soluzioni di riferimento*

I riferimenti dei pesticidi riportati in Tab. 1 debbono essere reperiti al più elevato grado di purezza possibile (comunque >95%, considerando le eventuali correzioni da apportare ai calcoli per livelli di purezza inferiori al 98%). In generale è preferibile acquistare il principio attivo puro a titolo noto, piuttosto che sue soluzioni a concentrazione nota, essendo queste ultime, generalmente, meno stabili. La purezza dei riferimenti deve essere controllata (ad esempio per via gascromatografica) prima delle analisi.

6.19.1 Soluzioni di riferimento concentrate dei singoli pesticidi

Pesare 0,01 g di principio attivo puro e scioglierlo in acetato d'etile, portando poi a volume in matraccio tarato da 10 mL (concentrazione finale di circa 1000 µg/mL). In alternativa, si può solubilizzare il principio attivo in esano o esano con l'aggiunta di qualche goccia di benzene, se la solubilizzazione nel solo esano è difficoltosa. Nella preparazione delle soluzioni di riferimento utilizzare tutte le cautele consigliate per la manipolazione di sostanze altamente tossiche. Le soluzioni di riferimento così ottenute vanno conservate al buio ed in frigorifero, controllandole periodicamente e comunque prima dell'analisi.

6.19.2 Soluzioni diluite dei singoli pesticidi

Preparare tali soluzioni diluendo opportunamente, con lo stesso solvente, le soluzioni concentrate (6.19.1), in modo da avere concentrazioni di 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL.

6.19.3 Soluzioni di riferimento cumulative

In rapporto a particolari problemi di separazione gascromatografica può essere utile preparare delle soluzioni cumulative, contenenti più principi attivi. Preparare le soluzioni diluendo opportunamente le soluzioni (6.19.1 e 6.19.2), ma preferibilmente a concentrazioni differenziate, in rapporto alla risposta dei vari principi attivi al rivelatore utilizzato.

6.19.4 Soluzioni di riferimento per le prove di recupero

Per le prove di recupero si debbono utilizzare riferimenti in un solvente miscibile con acqua. Si possono preparare queste soluzioni con le stesse procedure descritte in (6.19.1, 6.19.2, 6.19.3) utilizzando acetone o alcool etilico.

Per prove di recupero su tutti i pesticidi organofosforici considerati in Tab. 1, si consiglia di preparare due o più soluzioni di riferimento cumulative, miscelando i singoli principi attivi sul-

la base dei loro tempi di ritenzione (riportati in Tab. 2) allo scopo di evitare nei gascromatogrammi sovrapposizioni di picchi non risolti (vedi la composizione delle miscele riportate nei gascromatogrammi descritti più avanti).

Tabella 2: Tempi di ritenzione relativi ($t_{r \text{ paration-metile}} = 1$) dei pesticidi organofosforici determinati con una colonna SPB-5 adottando le condizioni operative descritte in Fig. 3

Composti	Tr (paration-metile)
Acefate	0,26
Azinfos-etile	2,29
Azinfos-metile	2,16
Bromofos	1,24
Clorfenvinfos E	1,31
Clorfenvinfos Z	1,35
Clorpirifos	1,18
Clorpirifos-metile	0,99
Demeton-O	0,48
Demeton-S-metile	0,49
Demeton-S-metilsolfone	1,09
Diazinone	0,84
Dimetoato	0,69
Eptenofos	0,42
Etion	1,73
Fenitrothion	1,11
Fosalone	2,20
Malaaxon	1,03
Malation	1,16
Metamidofos	0,09
Metidation	1,40
Monocrotofos	0,64
Ometoato	0,48
Paraaxon	1,06
Paraaxon-metile	0,85
Paration	1,19
Paration-metile	1 (9,20 min)
Pirimifos-metile	1,11
Tetraclorfenvinfos	1,45
Vamidotion	1,45

6.19.5 Soluzioni di riferimento per la cromatografia su gel di silice

Preparare una soluzione di riferimento con i principi attivi che interessano ad una concentrazione di circa 0,1 µg/mL in esano.

7. Procedimento

7.1 *Trattamento preliminare*

Attendere che il campione raggiunga la temperatura ambiente, se conservato in frigorifero. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire la migliore omogeneità. Controllare che il pH sia nell'intervallo 6,5-7,5 (eventualmente portare a pH=7 con 50 mL di tampone fosfato, 6.13).

7.2 Estrazione

Trasferire 500 mL di campione in un imbuto separatore da 1 L, aggiungere 75 mL di diclorometano e 100 mL di soluzione satura di cloruro di sodio. L'aggiunta del cloruro di sodio diminuisce il rischio di formazione di emulsioni e aumenta la solubilità dei composti più polari nella fase organica. Estrarre per 3 minuti con forte agitazione. Attendere la completa separazione delle due fasi e raccogliere la fase organica (fase inferiore), per percolazione su sodio solfato anidro (circa 30 g, per la colonna di disidratazione vedi 5.6.1) in una beuta. Ripetere l'estrazione con due successive aliquote di 60 mL di diclorometano. Lavare il sodio solfato con circa 20 mL di diclorometano che vengono raccolti insieme alle altre fasi organiche. Concentrare a piccolo volume (circa 2-3 mL) mediante evaporatore rotante con bagno termostatico a temperatura $\leq 45^{\circ}\text{C}$ e sotto vuoto moderato (400 mm Hg). Se si procede all'analisi gascromatografica diretta, senza alcuna purificazione, trasferire quantitativamente il residuo in provetta utilizzando per i lavaggi circa 5 mL di acetato d'etile e ridurre il volume, sotto corrente di azoto, sino a completa eliminazione del diclorometano. Portare a volume noto (1-5 mL) con acetato d'etile ed analizzare in gascromatografia con rivelatore FPD. Se si utilizza un volume di campione inferiore a 400 mL aggiungere al campione acqua distillata fino ad un volume di 500 mL e procedere all'estrazione come sopra descritto.

7.3 Purificazione

Nel caso l'analista giudichi necessaria la purificazione dell'estratto, sottoporre l'estratto ad una o più delle seguenti procedure.

7.3.1 Ripartizione n-esano/acetoneitrile

Questa procedura è utilizzata per separare grassi e oli dall'estratto. Non tutti i pesticidi organofosforici sono recuperati quantitativamente con questa procedura. L'analista deve provare preventivamente l'efficienza della ripartizione operando con riferimenti dei singoli pesticidi. In questo caso non si effettua il cambio di solvente esano-acetato di etile. Trasferire quantitativamente l'estratto esanico del campione in un imbuto separatore da 125 mL, lavando con n-esano fino ad un volume finale di 15 mL. Estrarre 4 volte il campione con porzioni di 30 mL di acetoneitrile, saturo di n-esano, agitando ogni volta vigorosamente per 1 minuto. Riunire gli estratti acetoneitrici in un imbuto separatore da 1 L, aggiungere 650 mL di acqua distillata (6.8) e 40 mL di soluzione satura di cloruro di sodio (6.12). Mescolare per 30-40 secondi ed estrarre due volte con 100 mL di n-esano agitando vigorosamente per circa 15 secondi. Riunire gli estratti esanici in imbuto separatore da 1 L e lavare con due porzioni di 100 mL di acqua distillata. Scartare lo strato acquoso ed asciugare la fase esanica su solfato di sodio (per la colonna di disidratazione vedi 5.6.1), raccogliendo l'eluato in pallone da 500 mL. Lavare l'imbuto separatore e la colonna con tre porzioni di 10 mL di esano. Riunire gli estratti ed i lavaggi e concentrare a piccolo volume (2-3 mL) mediante evaporatore rotante con bagno termostatico a temperatura $\leq 45^{\circ}\text{C}$ e sotto vuoto moderato (400 mm Hg). Se si procede all'analisi gascromatografica, senza ulteriore purificazione, trasferire quantitativamente il residuo in provetta utilizzando per i lavaggi circa 5 mL di acetato d'etile e ridurre il volume sotto corrente di azoto. Portare a volume noto (1-5 mL) con acetato d'etile ed analizzare quindi in gascromatografia con rivelatore FPD.

7.3.2 Rimozione dello zolfo elementare

Questa purificazione può essere necessaria qualora si intenda procedere ad analisi di conferma che prevedono l'uso di rivelatori per i quali la presenza di zolfo elementare rappresenta una seria interferenza (rivelatore fotometrico con filtro selettivo per lo zolfo, rivelatore di massa). È consigliabile comunque eseguire sempre questa purificazione in presenza di quantità notevoli di zolfo elementare. Preparare una microcolonna di adsorbimento utilizzando una pipetta di tipo Pasteur, inserendo sul fondo un piccolo batuffolo di lana di vetro. Riempire con allumina (6.15) sino ad una altezza di 3 cm e dopo assestamento ricoprire con

1 cm di solfato di sodio anidro. Concentrare l'estratto a piccolo volume (circa 2-3 mL) mediante evaporatore rotante con bagno termostatico a temperatura $\leq 45^{\circ}\text{C}$ e sotto vuoto leggero (400 mm Hg). Trasferire quantitativamente il residuo in provetta aiutandosi con circa 5 mL di esano e portare a circa 0,5 mL sotto corrente di azoto. Trasferire quantitativamente l'estratto esanico sulla colonna ed eluire con 3 mL di n-esano, scartando questo eluato. Di seguito proseguire l'eluizione con 5 mL di una miscela di n-esano/diclorometano 1:9 (v/v), raccogliendo l'eluato in provetta graduata. Concentrare a circa 1 mL sotto corrente di azoto. Se si procede all'analisi gascromatografica, senza ulteriore purificazione, aggiungere circa 5 mL di acetato d'etile e ridurre il volume, sotto corrente di azoto, sino a completa eliminazione del diclorometano/esano. Portare a volume noto (1-5 mL) con acetato d'etile ed analizzare in gascromatografia con rivelatore FPD.

7.3.3 Cromatografia su gel di silice disattivato al 6,5%

7.3.3.A Taratura dell'adsorbente

Prima di eseguire la cromatografia del campione, è indispensabile procedere alla taratura dell'adsorbente perché le caratteristiche possono variare ampiamente in relazione al tipo e al lotto di gel di silice. La taratura consiste nella definizione dei volumi di eluizione, utilizzando opportune soluzioni di riferimento dei pesticidi in esame, in modo da ottenere lo smistamento desiderato. I parametri indicati più avanti potranno dunque, dopo la fase di taratura dell'adsorbente, subire delle modifiche.

7.3.3.B Preparazione della colonna

Chiudere la parte inferiore della microcolonna (5.6.2) con un batuffolo di cotone sgrassato e versare nella colonna 2 g di gel di silice disattivato, in modo che la riempia fino ad una altezza di circa 20 cm (l'altezza è importante per la riproducibilità della separazione). Aggiungere un altro batuffolo di cotone sgrassato e uno strato di circa 1 cm di altezza di solfato di sodio anidro. Per il controllo dell'efficacia della colonna, senza prelavare il gel di silice aggiungere 1 mL di soluzione di riferimento cumulativa (6.19.5). Ciascun principio attivo dovrebbe essere ad una concentrazione di circa 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dopo adsorbimento, aggiungere 1 mL di esano (questa quantità serve per simulare il lavaggio del contenitore del campione). Dopo adsorbimento del solvente connettere il serbatoio alla colonna e quindi eluire, nell'ordine, con le seguenti miscele, cambiando il recipiente di raccolta quando il livello di un eluente raggiunge lo strato superiore del gel di silice:

- a) n-esano: 26 mL. Questa frazione non contiene pesticidi organofosforici, quindi può essere scartata (contiene i PCB ed alcuni pesticidi clorurati);
- b) benzene/esano (60:40): 15 mL. Questa frazione deve contenere bromofos, clorpirifos-metile, clorpirifos, fenitrotion;
- c) benzene: 14 mL. Questa frazione deve contenere fenitrotion, etion, paration, paration-metile, pirimifos-metile;
- d) etile acetato/benzene (1:1): 36 mL. Questa frazione deve contenere pirimifos-metile, paraoxon, paraoxon-metile, azinfos-etile, malation, malaoxon, diazinone, azinfos-metile, tetraclorvinfos, dimetoato.

Il flusso degli eluenti deve essere di circa 1-2 mL/min e può essere ottenuto applicando una lieve pressione in testa alla colonna. Raccogliere separatamente le frazioni b, c e d, concentrandole con l'evaporatore rotante e sotto leggero vuoto a piccolo volume ed effettuando per le frazioni b e c il cambio di solvente ad acetato d'etile. Portare a volume noto (1-5 mL) con acetato di etile ed analizzare in gascromatografia con rivelatore FPD.

C) Cromatografia del campione

Prima di procedere alla cromatografia, nel caso di campioni molto contaminati, l'estratto va

opportunamente diluito e la cromatografia su colonna effettuata su un'aliquota dello stesso. Usando la stessa tecnica utilizzata per la taratura dell'adsorbente e nelle condizioni di disattivazione prima identificate, introdurre la soluzione del campione concentrato ad 1 mL nella microcolonna e far adsorbire. Quindi, con 1 mL di esano lavare il contenitore del campione e introdurlo nella microcolonna. Eluire con i volumi più opportuni degli eluenti determinati nelle prove di taratura dell'adsorbente. Raccogliere separatamente le frazioni e procedere come descritto al punto 7.3.3.B. Eseguire l'analisi gascromatografica delle frazioni per la determinazione dei pesticidi.

Questa procedura di purificazione e frazionamento è utile nel caso di presenza nel campione di una miscela estremamente complessa di composti (pesticidi organoclorurati, PCB, pesticidi organofosforici, triazine). Utilizzare questa purificazione in genere quando l'analisi necessita di prove di conferma GC/MS o in GC/NPD.

7.4 Determinazioni gascromatografiche

Si consiglia di utilizzare come principale sistema di determinazione gascromatografica una colonna capillare a fase non polare (5% fenilsilicone + 95% metilsilicone, tipo SPB-5, DB-5 ecc.) ed un rivelatore FPD con filtro per il fosforo. Con tale colonna possono essere utilizzate le seguenti condizioni operative:

- Temperatura: iniettore 220°C, rivelatore (FPD-P) 250°C;
- colonna (30 m x 0,53 mm d.i.; spessore di fase 0,5 µm);
- programma di temperatura: 140°C per 2 min, quindi fino a 240°C a 5°C/min e 240°C per 2 min;
- gas di trasporto: azoto, 15 mL/min;
- gas ausiliario (make-up): azoto, 15 mL/min;
- Volume iniettato 1-3 µL.

Le condizioni gascromatografiche adottate sono accettabili quando 1 ng di metil-paration fornisce una risposta almeno pari al 40% dell'intera scala, con un rumore di fondo non superiore al 2%. I limiti di sensibilità strumentale (espressi in ng iniettati) e i gascromatogrammi di soluzioni di riferimento ottenute nelle condizioni indicate sono riportati, rispettivamente, in Tab. 3 ed in Fig. 3.

Tabella 3: Limiti di quantificazione degli insetticidi organofosforici, determinati con una colonna SPB-5 con rivelatore FPD-P (Segnale/rumore = 3; paration-metile (1 ng) = 40% f.s.d.)

Composti	ng	Composti	ng
Azinfos-etile	0,21	Fenitroton	0,18
Azinfos-metile	0,45	Fosalone	0,31
Bromofos	0,12	Malaoxon	0,29
Clorfenvinfos E	0,23	Malation	0,18
Clorfenvinfos Z	0,18	Metidation	0,17
Clorpirifos	0,13	Monocrotofos	0,55
Clorpirifos-metile	0,10	Ometoato	0,10
Demeton-O	0,07	Paraaxon	0,15
Demeton-S-metile	0,09	Paraaxon-metile	0,21
Demeton-S-metilsolfone	1,18	Paration	0,26
Diazinone	0,13	Paration-metile	0,12
Dimetoato	0,21	Pirimifos-metile	0,11
Eptenofos	0,09	Tetraclorvinfos	0,20
Etion	0,14	Vamidotion	1,31

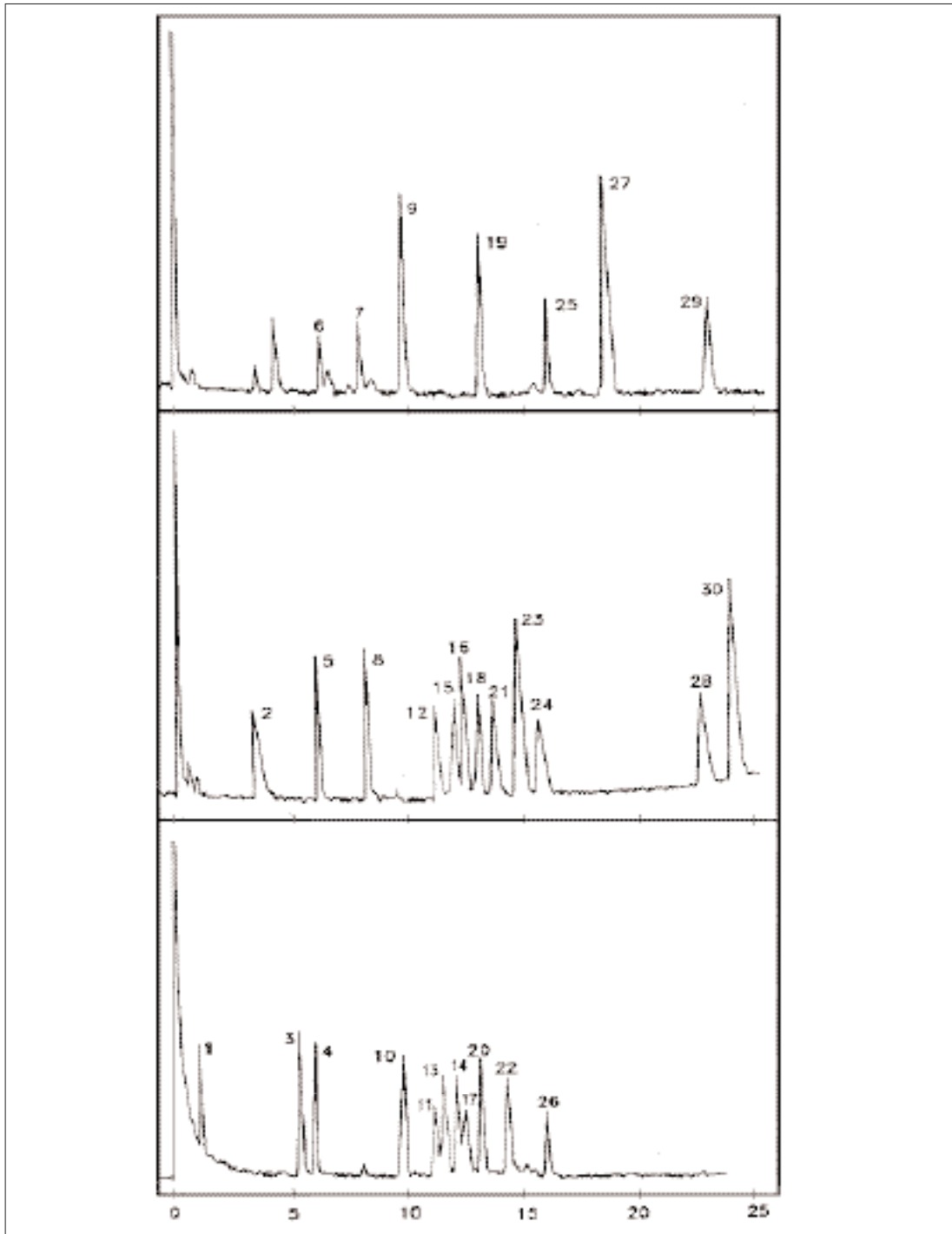


Figura 3: Gascromatogrammi di tre soluzioni di riferimento di insetticidi organofosforici, ottenuti nelle seguenti condizioni gascromatografiche: colonna SPB-5, temperatura 140°C per 2 min, aumenta a 240°C a 5°C/min e mantiene per 2 min; rivelatore FPD-P; velocità carta registratore 1 cm/min.
 1) metamidofos, 2) acefate, 3) eptenofos, 4) demeton-O, 5) demeton-S-metile, 6) ometoato, 7) monocrotofos, 8) dimetoato, 9) diazinone, 10) paraoxon-metile, 11) clorpirifos-metile, 12) paration-metile, 13) malaoxon, 14) demeton-S-metilsolfone, 15) paraoxon, 16) fenitrotion, 17) pirimifos-metile, 18) malation, 19) clorpirifos, 20) paration, 21) bromofos, 22) clorfenvinfos E, 23) clorfenvinfos Z, 24) metidation, 25) tetraclorfenvinfos, 26) vamidotion, 27) etion, 28) azinfos-metile, 29) fosalone, 30) azinfos-etile.

Altri dati relativi ai tempi di ritenzione dei pesticidi organofosforici su colonne con differenti fasi stazionarie sono disponibili in letteratura. Iniettare frequentemente le soluzioni di riferimento per controllare la stabilità delle condizioni operative.

Per l'analisi qualitativa confrontare i tempi di ritenzione dei picchi eventualmente presenti nel cromatogramma con quelli delle soluzioni di riferimento, iniettati prima e dopo il campione. Le miscele di iniezione di riferimento e campione devono essere nel medesimo solvente. Per la conferma qualitativa di un picco si può aggiungere metil-paration (od altro composto se il metil-paration è presente nel campione o se nel cromatogramma sono presenti picchi ad un tempo di ritenzione relativo al metil-paration compreso nell'intervallo 0,9-1,1), iniettare di nuovo e confermare i tempi di ritenzione relativi.

Per l'analisi quantitativa iniettare 1 µL di solvente per verificare che non vi siano picchi dovuti a residui dalle precedenti iniezioni. Iniettare le soluzioni di riferimento relativi ai composti identificati nel campione. La concentrazione del composto nella soluzione di riferimento deve essere dello stesso ordine di grandezza di quella del composto nel campione. Iniettare quindi il campione e confrontare l'area relativa al singolo composto nel campione con quella relativa allo stesso composto nel cromatogramma della soluzione di riferimento.

7.5 Analisi di conferma

7.5.1 Impiego del rivelatore NPD

Il confronto della risposta del rivelatore NPD con quella ottenuta con FPD-P può essere utile nella conferma della identificazione di un composto (sulla base delle risposte relative) quando il composto stesso contiene nella sua molecola anche atomi di azoto. La sensibilità di questo rivelatore è inoltre circa 10 volte maggiore di quella dell'FPD. Il rivelatore NPD può essere seriamente danneggiato da solventi clorurati. Per eliminare qualsiasi traccia di diclorometano nell'estratto del campione da analizzare riprendere l'estratto, portato a piccolo volume con circa 2 mL di acetato di etile, e portare a 200-500 µL in corrente di azoto. Portare a volume noto (1-5 mL) con acetato di etile ed iniettare.

7.5.2 Frazionamento per cromatografia su microcolonna di gel di silice

Il frazionamento dei pesticidi organofosforici in tre gruppi può essere utile come tecnica di conferma. Inoltre l'eliminazione dalla miscela da analizzare di composti clorurati (PCB, pesticidi clorurati) e di erbicidi triazinici può essere utile nel caso di determinazione in GC/NPD ed in alcuni casi in GC/MS.

7.5.3 Impiego del rivelatore di massa

Costituisce un utilissimo mezzo di identificazione in quanto la sua risposta è in relazione al peso molecolare e alla struttura del composto. Può essere necessario far precedere un'accurata purificazione e un frazionamento su gel di silice per eliminare dalla miscela idrocarburi ed altri composti che possono portare alla saturazione del rivelatore nella parte iniziale del cromatogramma, impedendo l'analisi dei composti di interesse con tempi di ritenzione brevi.

8. Calcoli

Il calcolo della concentrazione di un generico pesticida organofosforico "i" nel campione di acqua in esame si effettua applicando la seguente formula:

$$C_i = \frac{S \cdot A_c \cdot V_i}{A_i \cdot V_r \cdot V_c}$$

dove:

C_i = concentrazione (µg/L) del composto "i" identificato nel campione;

S = quantità (ng) di riferimento iniettato;

A_c = area del picco relativo al composto "i" nel campione*;

V_f = volume finale (μL) dell'estratto;
 A_s = area del picco relativo al composto "i" nel riferimento*;
 V_i = volume (μL) di estratto iniettato;
 V_c = volume (mL) di campione sottoposto all'analisi.

* le aree sono espresse in unità di misura convenzionali fornite dall'integratore.

9. Qualità del dato

Le prove di recupero, effettuate aggiungendo a 500 mL di acqua distillata 1 mL delle soluzioni di riferimento, hanno fornito i seguenti risultati (Tab. 4).

Tabella 4: Prove di recupero in acqua distillata (*estrazione non efficiente)

Composto	Concentrazione ($\mu\text{g/L}$)	Recupero (%)	Concentrazione ($\mu\text{g/L}$)	Recupero (%)
Acefate	37,8	*	3,0	*
Azinfos etile	42,2	90,1	1,7	99,3
Azinfos metile	61,0	97,6	4,9	112,0
Bromofos	43,2	88,2	3,5	83,1
Clorfenvinfos E	73,6	96,4	5,9	87,3
Clorfenvinfos Z	60,2	88,7	4,8	83,3
Clorpirifos	58,3	90,0	4,6	91,4
Clorpirifos-metile	62,8	92,3	5,0	86,7
Demeton-O	44,2	72,2	3,5	78,8
Demeton-S-metile	70,0	84,9	5,6	68,8
Demeton-S-metilsolfone	58,0	94,8	4,6	72,1
Diazinone	63,0	90,7	3,8	88,6
Dimetoato	47,6	88,8	3,8	82,6
Eptenofos	64,6	81,4	5,2	77,5
Etion	91,6	70,5	5,5	93,2
Fenitroton	84,2	88,9	6,7	90,0
Fosalone	64,4	71,2	2,9	99,1
Malaoxon	94,8	97,3	7,6	75,9
Malation	98,0	87,8	8,6	87,4
Metamidofos	58,6	*	4,7	*
Metidation	55,8	89,6	4,5	80,4
Monocrotofos	55,4	*	3,4	*
Paraoxon	77,2	89,7	6,1	90,8
Paraoxon-metile	126,2	92,8	10,0	79,6
Paration	50,8	95,7	4,0	94,0
Paration metile	51,6	88,5	4,1	81,8
Pirimifos-metile	42,2	96,4	3,4	85,4
Tetraclorvinfos	53,0	76,2	3,2	97,2
Vamidotion	65,0	94,6	6,0	102,8
Valori medi	63,9	88,3	4,8	87,3

I recuperi delle prove a concentrazione più elevata risultano compresi nell'intervallo 71-97%, con un recupero medio dell'88%; i recuperi delle prove a concentrazione più bassa risultano compresi nell'intervallo 72-112% con un recupero medio dell'88%.

La tecnica di estrazione descritta non è efficace per l'acefate, il metamidofos e il monocrotofos (recupero percentuale 5-30%), a causa della loro elevata solubilità in acqua che è 650 g/L, 2000 g/L e 1000 g/L rispettivamente. Per l'estrazione di composti così altamente solu-

bili in acqua è necessario adottare condizioni più favorevoli per l'estrazione con solventi organici: saturazione della fase acquosa con cloruro di sodio, utilizzo di miscele organiche estraenti a polarità più elevata, come ad esempio un azeotropo cloroformio/acetone 4/1 (p/p) (Metodo 1657, EPA) e rapporto volume fase organica/volume fase acquosa più elevato. In alternativa, per controllo di acque di scarico di processi industriali relativi a tali principi attivi, si può iniettare direttamente il campione acquoso (eventualmente diluito 1:1 con acetone). Più opportunamente si può fare riferimento al metodo descritto in letteratura da Gerhart e Cortes, ove viene trattato esaurientemente il metodo di iniezione di campioni acquosi. Prove di recupero effettuate su acque di scarico hanno sostanzialmente confermato i risultati ottenuti dalle prove di recupero da acqua distillata. I risultati relativi ad una prova di recupero sono riportati, a titolo di esempio in Tab. 5 ed in Fig. 4. Il gascromatogramma dell'estratto dell'acqua di scarico (Fig. 4, B), presenta un picco (c) identificato (tramite GC-MS, dopo puri-

Tabella 5: Prove di recupero in acqua di scarico (* estrazione non efficiente)

Composto	Concentrazione (µg/L)	Recupero %
Acefate	3,0	*
Azinfos etile	1,7	83,7
Azinfos metile	4,9	92,4
Bromofos	3,5	69,2
Clorfenvinfos Z	4,8	75,4
Demeton-S-metile	5,6	84,1
Dimetoato	3,8	88,7
Fenitroton	6,7	93,7
Malation	8,6	78,3
Metidation	4,5	80,9
Paraoxon	6,1	82,4
Paration metile	4,1	81,8
Valori medi	5,2	82,8

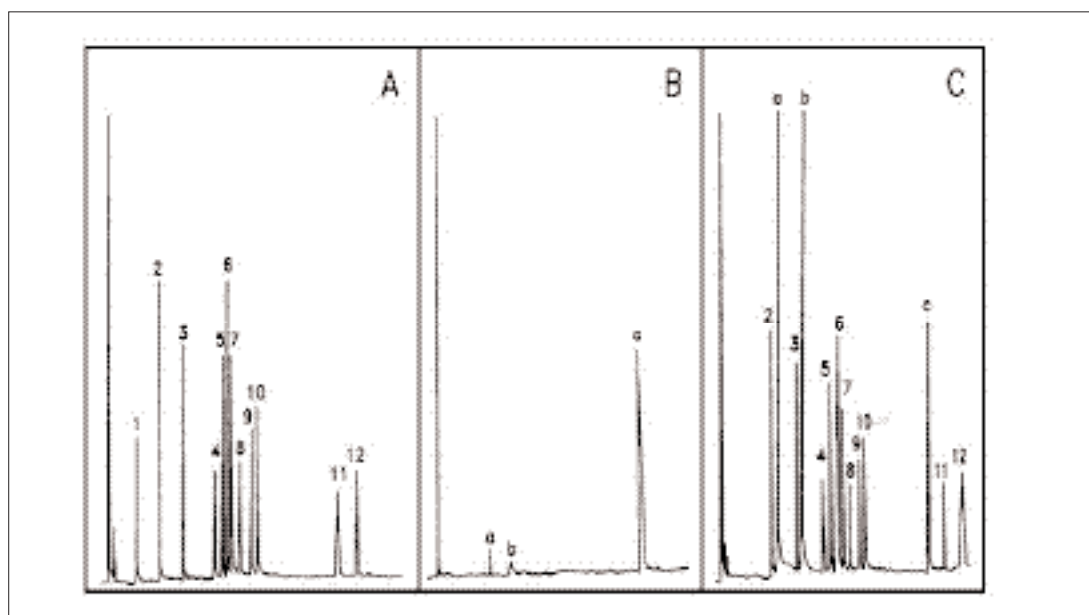


Figura 4: Gascromatogrammi di (A) soluzione di riferimento di insetticidi organofosforici, (B) estratto di acqua di scarico, (C) recupero da acqua di scarico addizionata di composti organofosforici.

Condizioni gascromatografiche: colonna SPB-5, temperatura 140°C per 2 min, aumenta a 240°C a 5°C/min e mantiene per 2 min; rivelatore FPD-P; velocità carta stampante 0,5 cm/min.

1) acefate, 2) demeton-O, 3) dimetoato, 4) paration-metile, 5) paraoxon, 6) fenitroton, 7) malation, 8) bromofos, 9) clorfenvinfos Z, 10) metidation, 11) azinfos-metile, 12) azinfos-etile, a) tributil-fosfato, b) tris(2-cloroetil)fosfato, c) tris(2-butossietil) fosfato.

ficazione e frazionamento dell'estratto su gel di silice) come il tris(2-butossietil)fosfato. Altri picchi (a e b) sono dovuti alla presenza in tracce di tributilfosfato e tris(2-cloro-etil)fosfato rispettivamente. Allo scopo di verificare il loro comportamento all'estrazione, questi due fosfati organici, spesso presenti nelle acque di scarico a causa del loro ampio uso come additivi industriali, sono stati addizionati al campione insieme alla miscela di insetticidi organofosforici.

Nota: si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico". Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

ALBANIS T.A., POMONIS P.J. & SDOUKOS A.Th. (1986): "Organophosphorus and carbamates pesticide residues in the aquatic system of Ioannina basin and Kalamas river", *Chemosphere*, **15**, 1023.

ALESSANDRINI M.E., LEONI V., DI SIMONE L., IMBROGLINI G. & ANGELELLI L. (1968): "Andamento dei residui di malathion nei grani trattati in scala semi-industriale e nei relativi prodotti di molitura", *Rassegna Chimica*, **5**, 201.

ANG C., MELEADY K. & WALLACE L. (1989): "Pesticide residues in drinking water in the North Coast Region of New South Wales, Australia", 1986-87", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **42**, 595.

APHA, AWWA, WEF (1981): "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" - Supplement to the XV Edition "Selected analytical methods approved and cited by the United States Environmental Protection Agency - Method for Organophosphorous Pesticides in Water and Wastewater", SS 1-557.

BAGNATI R., BENFENATI E., DAVOLI E. & FANELLI R. (1988): "Screening of 21 pesticides in water by single extraction with C₁₈ silica bonded phase columns and HRGC-MS", *Chemosphere*, **17**, 59.

BARCELÒ D., PORTE C., CID J. & ALBAIGÉS J. (1990): "Determination of organophosphorus compounds in mediterranean waters and biota samples using gas chromatography with nitrogen-phosphorus and chemical ionization mass spectrometric detection", *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **38**, 199.

BARDAROV V. & MITEWA M. (1989): "High-performance liquid and gas chromatography of dialkylphosphates, dialkylthiophosphates and dialkyl dithiophosphates as their pentafluorobenzyl derivatives", *J. Chromatogr.*, **462**, 233.

BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL (1991): "The Pesticide Manual", IX edition, C.R. Worthing, Great Britain.

BROOKS M.W., TESSIER D., SODERSTROM D. JENKINS J. & MARSHALL CLARK J. (1990): "A rapid method for the simultaneous analysis of Chlorpyrifos, Isophenos, Carbaryl, Iprodione, and Triadimefon in groundwater by solid-phase extraction", *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 487.

CARRASCO J.M., PIANTA M., GOMEZ-CASALS W. & MORAGUES W. (1987): "Pesticide residues in Lake Albufera, Valencia, Spain", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 752.

CUNNINGHAM L.W. (1957): "Proposed Mechanism of action of hydrolitic enzymes", *Science*, **125**, 1145.

DI CORCIA A. & MARCHETTI M. (1991): "Multiresidue method for pesticides in drinking water using a graphitized Carbon Black cartridge extraction and liquid chromatographic analysis", *Anal. Chem.*, **63**, 580.

Decreto Legislativo 152/99, Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole, *G.U. n. 124, 29 maggio 1999, Supplemento Ordinario n. 101/L*.

ETO M. (1974): in "Organophosphorous pesticides: organic and biological chemistry", G. Zweigg editor, CRC Press Inc., Washington D.C., 123-192.

FARRAN A., DE PABLO J. & BARCELÒ D. (1988): "Identification of organophosphorus insecticides and their hydrolysis products by liquid chromatography in combination with UV and thermospray-mass spectrometric detection", *J. Chromatogr.*, **455**, 163.

FOLLWEILER J.M. & SHERMA J. (1984): in "CRC Handbook of Chromatography: Pesticides and Related Organic Chemicals", G. Zweigg and J. Sherma Editors, CRC Press, Inc., Boca Raton - Florida, Vol. I, pp. 67-85.

GERHART B.B. & CORTES H.J. (1990): "Determination of chlorpyrifos in water by large-volume direct aqueous injection capillary gas chromatography", *J. Chromatogr.*, **503**, 377.

GREVE P.A. & GOEWIE C.E. (1985): "Developments in the determination of organophosphorus pesticides", *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **20**, 29.

HEATH D.F. (1961): in "Organophosphorous Poisons: Anticholinesterases and related compounds", International Series of Monographs on Pure and Applied Biology: Modern trends in physiological sciences. Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris, pp. 116-255.

KRUPKA R.M. (1966): "Chemical structure and function of the active center of acetylcholinesterase", *Biochemistry*, **5**, 1988.

LAW L.M. & GEORLITZ D.F. (1970): "Microcolumn chromatographic cleanup for the analysis of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **53**, 1276.

LAWRENCE J., TOSINE H.M. & HELLE M. (1977): "Polychlorinated biphenyl concentrations in sewage and sludges of some waste treatment plants in southern Ontario", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **17**, 49.

LEES A. & MACVEIGH K. (1988): "An investigation of pesticide pollution in drinking water in England and Wales", Report pp. 151.

LEONI V., CREMISINI C., CASUCCIO A. & GULLOTTI A. (1991): "The separation of pesticides and related compounds, polychlorobiphenyls and other pollutants into four groups by silica gel microcolumn chromatography (Application to surface water analysis)", *Pest. Sci.*, **31**, 209-220.

- LEONI V., CARICCHIA A.M. & CHIAVARINI S. (1992): "Multiresidue method for quantitation of organophosphorus pesticides in vegetable and animal foods", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **75**, 511.
- LEONI V. & PUC CETTI G. (1971): "Cromatografia su strato sottile di pesticidi organofosforici in rapporto a studi di contaminazione ambientale (acque superficiali italiane)", *Il Farmaco*, **26**, 383.
- LEONI V. & PUC CETTI G. (1978): "Stato di inquinamento da pesticidi del fiume Tevere e del suo bacino imbrifero", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **27**, 328.
- LEONI V., PUC CETTI G., COLOMBO J. & D'OIDIO A.M. (1976): "The use of Tenax for the extraction of pesticides and polychlorinated biphenyls from water. II. Tests with artificially polluted and natural waters", *J. Chromatogr.*, **125**, 399.
- LOCONTO P.R. & GAIND A.K. (1989): "Isolation and recovery of organophosphorus pesticides from water by solid-phase extraction with dual wide-bore capillary gas chromatography", *J. Chromatogr. Sci.*, **27**, 569.
- MALLET C. & MALLET V.N. (1989): "Conversion of a conventional packed-column gas chromatograph to accommodate megabore columns. II. Determination of organophosphorus pesticides in environmental water", *J. Chromatogr.*, **481**, 37.
- MANES VINUESA J., MOLTO CORTES J.C., IGUALDA CANAS C. & FONT PEREZ G. (1989): "Isolation and concentration of organophosphorus pesticides from water using a C₁₈ reversed phase", *J. Chromatogr.*, **472**, 365.
- MATTERN G.C., LOUIS J.B. & ROSEN J.D. (1991): "Multipesticide determination in surface water by gas chromatography/chemical ionization/mass spectrometry/ion trap detection", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 982.
- MELNIKOV N.N. (1971): "Chemistry of pesticides. Organophosphorus compounds", *Residue Reviews*, **36**, 303-386.
- Ministero della Sanità, Consiglio Sanitario Nazionale (1992): "Relazione su stato sanitario del Paese, 1989", vol. I, 230. Ed. Istituto Poligrafico dello Stato, Roma.
- MOLTÒ J.C., PICÒ Y., FONT G. & MANES J. (1991): "Determination of triazines and organophosphorus pesticides in water samples using solid-phase extraction", *J. Chromatogr.*, **555**, 137.
- NEICHEVA A., KOVACHEVA E. & MARUDOV G. (1988): "Determination of organophosphorus pesticides in apples and water by gas-liquid chromatography with electron-capture detection", *J. Chromatogr.*, **437**, 249.
- O'BRIEN R.D. (1969): "Binding sites of cholinesterases", *Biochem. J.*, **113**, 713.
- PREMAZZI G. (1983): "Evaluation of the impact of malathion on the aquatic environment", EEC, Joint Research Center, Ispra, I, 1-67.
- PRINSLOO S.M. & DE BEER P.R. (1987): "Gas chromatographic relative retention data for pesticides on fine packed columns: II. organophosphorus and organochlorine pesticides, using electron-capture detection", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 878.
- REDING R. (1987): "Chromatographic monitoring methods for organic contaminants under the Safe Drinking Water Act", *J. Chromatogr. Sci.*, **25**, 338.

ROWLANDS D.G. & HORLER D.F. (1967): "Malathion residues in wheat", *Proc. of IV Brit. Insecticides and Fungicides Conference*, Vol. I, 331.

STOUT S.J., DA CUNHA A., BOYD J.E. & DEVINE J.M. (1989): "Confirmation of phorate, terbufos and their sulfoxides and sulfones in water by capillary gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 987.

THOMPSON J.F., MANN J.B., APODACA A.O. & KANTOR E.J. (1975): "Relative retention ratios of 95 pesticides and metabolites on nine gas-liquid chromatographic columns over a temperature range of 170 to 204°C in two detection modes", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **58**, 1037.

TSUDA T., AOKI S., KOJIMA M. & FUJITA T. (1992): "Pesticides in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa", *Chemosphere*, **24**, 1523.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1986): Method 507, "Determination of Nitrogen- and Phosphorous-Containing Pesticides in Groundwater by Gas Chromatography with a Nitrogen-Phosphorous Detector", Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, OH 45268.

U.N.E.P. (1991): "Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by Organophosphorous compounds", MAP Technical Reports Series No. 58, pp. 122.

WILKINS J.P.G., HILL A.R.C. & LEE D.F. (1985): "Organophosphorus sulphides, sulphoxides and sulphones. Part 2. Characterisation by gas chromatography-mass spectrometry", *Analyst*, **110**, 1045.

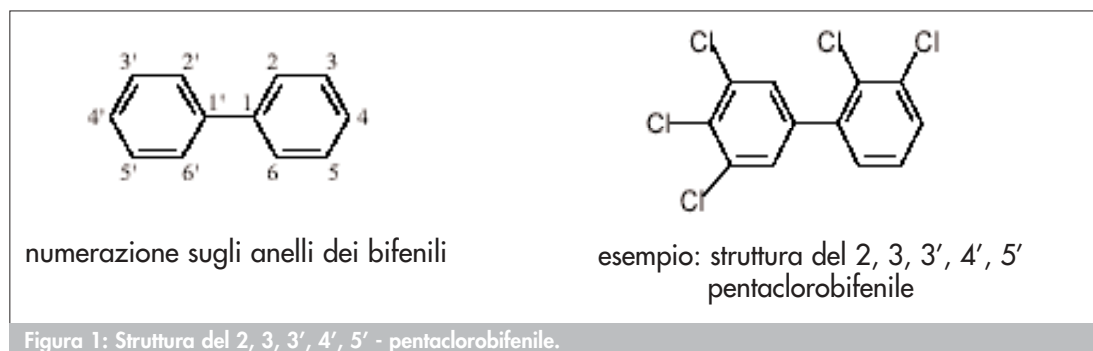
5110. Policlorobifenili e policloroterfenili

I policlorobifenili (PCB) costituiscono una classe di 209 composti, aventi da 1 a 10 atomi di cloro come sostituenti nella molecola del bifenile. La struttura generale dei PCB, la suddivisione per classi isomeriche (congeneri con eguale numero di atomi di cloro in molecola), la composizione delle più comuni miscele commerciali e l'elenco dei 209 congeneri con la numerazione sistematica stabilita da Ballschmiter e Zell sono riportati in Fig. 1 e nelle Tabb. 1A, 1B e 2. I PCB possiedono proprietà tali (ininfiammabilità, bassissima volatilità a temperatura ambiente, ecc.) da renderli adatti a numerosi impieghi industriali (dielettrici per trasformatori e condensatori, fluidi per il trasporto del calore, inchiostri da stampa e carte copiatrici "senza carbone", vernici, plastificanti, oli da taglio, ecc.). Quasi tutti questi impieghi sono oggi cessati, in rapporto al progredire delle conoscenze sulla pericolosità ambientale dei PCB e sulla loro tossicità per l'uomo. D'altra parte se si considera che un trasformatore industriale ha una vita media di 15-20 anni e può contenere alcuni quintali di PCB, ben si comprende la necessità di controllare, anche in futuro, ogni possibile sorgente di contaminazione. Quindi per le loro caratteristiche di elevata persistenza ambientale e tossicità i PCB sono stati classificati tra i prodotti pericolosi da regolamentare in maniera prioritaria. Inoltre sono stati identificati e dosati, in Italia ed altrove, nelle acque dolci superficiali, nelle acque marine e nei sedimenti e, poichè si bioconcentrano ai vari livelli della catena alimentare, soprattutto in matrici biologiche.

I PCB, con diverse denominazioni, sono stati prodotti da vari paesi industrializzati: Aroclor (USA), Fenclor (Italia), Clophen (Germania), Phenoclor (Francia), ecc. Opportune sigle numeriche, che fanno riferimento soprattutto alla percentuale in cloro dei prodotti commerciali, consentono di differenziare tra loro i vari prodotti di una stessa serie (esempio Aroclor 1260, contenuto percentuale di cloro 60%; il 12 si riferisce al numero di atomi di carbonio nella molecola del bifenile). Le Tabb. 3A e 3B riassumono le principali caratteristiche di alcune miscele commerciali di PCB. Ai fini del metodo occorre rilevare che oggi tutti gli isomeri sono disponibili in commercio al grado di purezza di standard analitico così come le principali miscele commerciali.

I PCB, una volta immessi nell'ambiente, possono andare incontro a destini diversi: gli isomeri con maggior numero di atomi di cloro sono generalmente i più stabili, mentre quelli a più basso livello di clorurazione sono soggetti ad una lenta degradazione, in particolare ad opera di microrganismi. Ne consegue che ogni campione ambientale può presentare una particolare distribuzione dei diversi isomeri e, generalmente, non si ha corrispondenza tra miscele commerciali di PCB e campione analizzato. Nelle acque di scarico tale corrispondenza è più probabile poichè la contaminazione, se presente, è presumibilmente dovuta a diretta immissione di residui che hanno subito scarsa o nessuna modificazione degradativa.

I policloroterfenili (PCT) presentano caratteristiche chimiche e fisiche analoghe a quelle dei po-



COSTITUENTI ORGANICI

Tabella 1A - Classi isomeriche dei PCB

classe isomerica	formula	peso molecolare	% cloro	numero isomeri
mono-CB	C ₁₂ H ₉ Cl	188	18	3
di-CB	C ₁₂ H ₈ Cl ₂	222	31	12
tri-CB	C ₁₂ H ₇ Cl ₃	256	41	24
tetra-CB	C ₁₂ H ₆ Cl ₄	290	48	42
penta-CB	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	324	54	46
esa-CB	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	358	58	42
epta-CB	C ₁₂ H ₃ Cl ₇	392	62	24
otta-CB	C ₁₂ H ₂ Cl ₈	426	65	12
nona-CB	C ₁₂ H ₁ Cl ₉	460	68	3
deca-CB (DCB)	C ₁₂ Cl ₁₀	494	79	1

Tabella 1B: Quantità percentuale delle classi isomeriche dei PCB nelle quattro più comuni miscele commerciali (Aroclors)

classe isomerica	1242	1248	1254	1260
mono-CB	3	-	-	-
di-CB	13	2	-	-
tri-CB	28	18	-	-
tetra-CB	30	40	11	-
penta-CB	22	36	49	12
esa-CB	4	4	34	38
epta-CB	-	-	6	41
otta-CB	-	-	-	8
nona-CB	-	-	-	1
deca-CB (DCB)	-	-	-	-

Tabella 2: Nomenclatura sistematica dei PCB (da Ballschmiter)

No.	struttura	No.	struttura	No.	struttura	No.	struttura
mono-CB							
1	2	52	2.2'.5.5'	105	2.3.3'.4.4'	161	2.3.3'.4.5'.6
2	3	53	2.2'.5.6'	106	2.3.3'.4.5	162	2.3.3'.4'.5.5'
3	4	54	2.2'.6.6'	107	2.3.3'.4'.5	163	2.3.3'.4'.5.6
		55	2.3.3'.4	108	2.3.3'.4.5'	164	2.3.3'.4'.5'.6
di-CB							
		56	2.3.3'.4'	109	2.3.3'.4.6	165	2.3.3'.5.5'.6
4	2.2'	57	2.3.3'.5	110	2.3.3'.4'.6	166	2.3.4.4'.5.6
5	2.3	58	2.3.3'.5'	111	2.3.3'.5.5'	167	2.3'.4.4'.5.5'
6	2.3'	59	2.3.3'.6	112	2.3.3'.5.6	168	2.3'.4.4'.5'.6
7	2.4	60	2.3.4.4'	113	2.3.3'.5'.6	169	3.3'.4.4'.5.5'
8	2.4'	61	2.3.4.5	114	2.3.4.4'.5		
9	2.5	62	2.3.4.6	115	2.3.4.4'.6		epta-CB
10	2.6	63	2.3.4'.5	116	2.3.4.5.6	170	2.2'.3.3'.4.4'.5
11	3.3'	64	2.3.4'.6	117	2.3.4'.5.6	171	2.2'.3.3'.4.4'.6
12	3.4	65	2.3.5.6	118	2.3'.4.4'.5	172	2.2'.3.3'.4.5.5'
13	3.4'	66	2.3'.4.4'	119	2.3'.4.4'.6	173	2.2'.3.3'.4.5.6
14	3.5	67	2.3'.4.5	120	2.3'.4.5.5'	174	2.2'.3.3'.4.5.6'
15	4.4'	68	2.3'.4'.5	121	2.3'.4.5'.6	175	2.2'.3.3'.4.5'.6
tri-CB							
		70	2.3'.4.5'	123	2'.3.4.4'.5	177	2.2'.3.3'.4'.5.6
16	2.2'.3	71	2.3'.4'.6	124	2'.3.4.5.5'	178	2.2'.3.3'.5.5'.6
17	2.2'.4	72	2.3'.5.5'	125	2'.3.4.5.6'	179	2.2'.3.3'.5.6.6'
18	2.2'.5	73	2.3'.5'.6	126	3.3'.4.4'.5	180	2.2'.3.4.4'.5.5'
19	2.2'.6	74	2.4.4'.5	127	3.3'.4.5.5'	181	2.2'.3.4.4'.5.6

segue

COSTITUENTI ORGANICI

segue

No.	struttura	No.	struttura	No.	struttura	No.	struttura
20	2.3.3'	75	2.4.4'.6			182	2.2'.3.4.4'.5.6'
21	2.3.4	76	2'.3.4.5	Esa-CB		183	2.2'.3.4.4'.5'.6
22	2.3.4'	77	3.3'.4.4'	128	2.2'.3.3'.4.4'	184	2.2'.3.4.4'.6.6'
23	2.3.5	78	3.3'.4.5	129	2.2'.3.3'.4.5	185	2.2'.3.4.5.5'.6
24	2.3.6	79	3.3'.4.5'	130	2.2'.3.3'.4.5'	186	2.2'.3.4.5.6.6'
25	2.3'.4	80	3.3'.5.5'	131	2.2'.3.3'.4.6	187	2.2'.3.4'.5.5'.6
26	2.3'.5	81	3.4.4'.5	132	2.2'.3.3'.4.6'	188	2.2'.3.4'.5.6.6'
27	2.3'.6			133	2.2'.3.3'.5.5'	189	2.3.3'.4.4'.5.5'
28	2.4.4'		penta-CB	134	2.2'.3.3'.5.6	190	2.3.3'.4.4'.5.6
29	2.4.5	82	2.2'.3.3'.4	135	2.2'.3.3'.5.6'	191	2.3.3'.4.4'.5'.6
30	2.4.6	83	2.2'.3.3'.5	136	2.2'.3.3'.6.6'	192	2.3.3'.4.5.5'.6
31	2.4'.5	84	2.2'.3.3'.6	137	2.2'.3.4.4'.5	193	2.3.3'.4'.5.5'.6
32	2.4'.6	85	2.2'.3.4.4'	138	2.2'.3.4.4'.5'		
33	2'.3.4	86	2.2'.3.4.5	139	2.2'.3.4.4'.6		otta-CB
34	2'.3.5	87	2.2'.3.4.5'	140	2.2'.3.4.4'.6'	194	2.2'.3.3'.4.4'.5.5'
35	3.3'.4	88	2.2'.3.4.6	141	2.2'.3.4.5.5'	195	2.2'.3.3'.4.4'.5.6
36	3.3'.5	89	2.2'.3.4.6'	142	2.2'.3.4.5.6	196	2.2'.3.3'.4.4'.5'.6
37	3.4.4'	90	2.2'.3.4'.5	143	2.2'.3.4.5.6'	197	2.2'.3.3'.4.4'.6.6'
38	3.4.5	91	2.2'.3.4'.6	144	2.2'.3.4.5'.6	198	2.2'.3.3'.4.5.5'.6
39	3.4'.5	92	2.2'.3.5.5'	145	2.2'.3.4.6.6'	199	2.2'.3.3'.4.5.6.6'
		93	2.2'.3.5.6	146	2.2'.3.4'.5.5'	200	2.2'.3.3'.4.5'.6.6'
	tetra-CB	94	2.2'.3.5.6'	147	2.2'.3.4'.5.6	201	2.2'.3.3'.4'.5.5'.6
40	2.2'.3.3'	95	2.2'.3.5'.6	148	2.2'.3.4'.5.6'	201	2.2'.3.3'.5.5'.6.6'
41	2.2'.3.4	96	2.2'.3.6.6'	149	2.2'.3.4'.5'.6	203	2.2'.3.4.4'.5.5'.6
42	2.2'.3.4'	97	2.2'.3'.4.5	150	2.2'.3.4'.6.6'	204	2.2'.3.4.4'.5.6.6'
43	2.2'.3.5	98	2.2'.3'.4.6	151	2.2'.3.5.5'.6	205	2.3.3'.4.4'.5.5'.6
44	2.2'.3.5'	99	2.2'.4.4'.5	152	2.2'.3.5.6.6'		
45	2.2'.3.6	100	2.2'.4.4'.6	153	2.2'.4.4'.5.5'		nona-CB
46	2.2'.3.6'	101	2.2'.4.5.5'	154	2.2'.4.4'.5.6'	206	2.2'.3.3'.4.4'.5.5'.6
47	2.2'.4.4'	102	2.2'.4.5.6'	155	2.2'.4.4'.6.6'	207	2.2'.3.3'.4.4'.5.6.6'
48	2.2'.4.5	103	2.2'.4.5'.6	156	2.3.3'.4.4'.5	208	2.2'.3.3'.4.5.5'.6.6'
49	2.2'.4.5'	104	2.2'.4.6.6'	157	2.3.3'.4.4'.5'		
50	2.2'.4.6			158	2.3.3'.4.4'.6		deca-CB
51	2.2'.4.6'			159	2.3.3'.4.5.5'	209	2.2'.3.3'.4.4'.5.5'.6.6'
				160	2.3.3'.4.5.6		

liclorobifenili. Essi erano presenti in prodotti commerciali, soprattutto negli USA, anche in miscela con i PCB. Sono conosciuti in Italia con il nome generico di Cloresil e negli USA con la stessa denominazione di Aroclor, già utilizzata per i PCB. In quest'ultimo caso sigle di riferimento opportune differenziano i PCB dai PCT, così gli Aroclor 5432, 5442 e 5460 sono miscele di policloroterfenili contenenti cloro in misura rispettivamente del 32%, 42% e 60% in peso; il 54 della sigla deriva da 18 (numero di atomi di carbonio del terfenile) moltiplicato 3 (numero di isomeri del terfenile: orto, meta e para).

Dal punto di vista normativo i PCB e i PCT sono stati assimilati ai pesticidi clorurati, nonostante la diversa utilizzazione e la diversa tossicità ed i limiti di concentrazione nelle acque di scarico (0,05 mg/L, Tab. 3, All. 5 del D.Lgs.152/99) vengono riferiti al totale di pesticidi clorurati + PCB + PCT.

Questo metodo permette la determinazione di PCB e PCT nelle acque di scarico. La determinazione dei PCT è inserita nel metodo allo scopo di adeguare il metodo stesso alla normativa vigente; d'altra parte, considerando il limitatissimo impiego che hanno avuto questi composti in Italia e la scarsità di dati sulla loro presenza nelle acque ed in altre matrici (con conseguente difficoltà di valutare l'affidabilità delle procedure analitiche), la loro presenza nei campioni da analizzare appare assai poco probabile.

Molte fasi della procedura per la determinazione dei PCB e PCT sono le stesse di quella per la determinazione dei pesticidi clorurati (Sezione 5090 "Pesticidi clorurati"), in quanto questi composti sono strettamente correlati dal punto di vista chimico. Si consiglia pertanto di leggere attentamente quel metodo, al quale spesso si fa riferimento e si rimanda.

La procedura analitica seguita e le modalità di espressione dei risultati rivestono un'importanza fondamentale nella determinazione dei PCB.

Il risultato finale può essere espresso infatti in $\mu\text{g/L}$ di una o più miscele commerciali (ad esempio Aroclors) ed in questo caso è necessario individuare nel campione una distribuzione dei singoli congeneri simile od eguale a quella della/delle miscele commerciali.

Utilizzando un rivelatore di massa operante in SIM (Selected Ion Monitoring), si possono invece dosare le diverse classi isomeriche o buona parte dei singoli isomeri ed esprimere il risultato come $\mu\text{g/L}$ di "PCB totali". Entrambi questi metodi di calcolo quantitativo permettono una valutazione adeguata del campione in base alla normativa italiana che non fornisce nessuna indicazione in merito e parla solo genericamente di "PCB totali".

Si può infine esprimere il risultato in "equivalenti di decaclorobifenile (DCB)" quando per la determinazione si adotta il metodo della perclorazione che trasforma tutti i PCB in DCB; quest'ultima procedura non fornisce nessuna informazione sui singoli PCB, né sulla miscela commerciale (una o più) responsabile della contaminazione.

1. Principio del metodo

Il metodo consiste in estrazione liquido-liquido con miscela n-esano/diclorometano, purificazione preliminare per ripartizione con acetone/nitrile, eliminazione dello zolfo e purificazione/frazionamento per cromatografia su gel di silice. L'analisi finale è eseguita mediante gascromatografia/spettrometria di massa (GC-MS) o gascromatografia/rivelatore a cattura di elettroni (GC-ECD).

Tabella 3A: Caratteristiche chimico-fisiche di alcuni policlorobifenili (Fenclor)

Caratteristiche	Fenclor 42	Fenclor 54	Fenclor 64	Fenclor 70
Stato fisico a 20°C	liquido	olio viscoso	resina molle	resina dura
Costituenti principali	triclorobifenili	pentaclorobifenili	esaclorobifenili	epta-octa-clorobifenili
Contenuto medio in cloro (% in peso)	38-41	50-54	58-62	63-68
Densità a 20°C	1,37-1,39	1,52-1,39	1,63-1,64	1,67-1,68
Punto di combustione (°C)	335	nessuno	nessuno	nessuno
Perdita all'evaporazione (6 ore a 100 °C)	0,0-0,4%			
Viscosità Engler a 25°C	4-5	-	-	-
a 98°C	-	1,3-1,4	2,1-2,3	3,3-3,6

Tabella 3B: Caratteristiche chimico-fisiche di alcuni policlorobifenili prodotti in USA (Aroclor)

Caratteristiche	Aroclor 1221	Aroclor 1016	Aroclor 1242	Aroclor 1254	Aroclor 1260
Stato fisico a T ambiente	olio	olio	olio	liquido viscoso	resina molle
Contenuto medio in cloro (% in peso)	20,5-21,5	41	42	54	60
Densità a 20°C	1,18-1,19	-	1,38-1,39	-	1,50
Temperatura di infiammabilità (°C; Cleveland open cup)	141-150	-	176-180	nessuna	nessuna
Velocità di vaporizzazione ($\text{g/cm}^2/\text{h}$ a 100°C)	0,00174	-	0,000338	0,000053	0,000009
Viscosità (37,8°C; sec. Saybolt Universal)	38-41	71-81	82-92	1800-2500	-

2. Campo di applicazione

Il metodo permette la determinazione dei PCB e PCT nelle acque di scarico a livelli di concentrazione abbondantemente inferiori a 0,1 µg/L per singolo composto.

3. Interferenze e cause di errore

La possibile contaminazione dei solventi, dei reagenti e della vetreria impiegati nell'analisi, l'eventuale contaminazione dello stesso ambiente di lavoro e, in generale, ogni trattamento del campione possono causare problemi e portare alla presenza di picchi interferenti nei cromatogrammi e/o alterazioni della corrente di fondo del rivelatore con conseguenti difficoltà di interpretazione e/o interpretazioni errate del tracciato gascromatografico. Tutti i materiali utilizzati devono essere, pertanto, esenti da interferenze nelle condizioni operative adottate. È quindi buona norma di laboratorio, all'inizio dell'indagine e periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi", sostituendo al campione acqua distillata, per la verifica di eventuali interferenze provenienti dai materiali. Nel caso di presenza di interferenze, occorre individuarne la provenienza, analizzando ogni singolo passaggio della procedura e procedere alla loro eliminazione. Può essere richiesta una specifica selezione dei reattivi ed una purificazione dei solventi per mezzo di distillazione.

Le sostanze di varia natura estratte insieme ai PCB dagli effluenti industriali sono in quantità non trascurabile e possono causare difficoltà nell'ottenere misure precise ed accurate, soprattutto quando si usa un rivelatore a cattura di elettroni.

Uno dei maggiori problemi nelle determinazioni gascromatografiche di inquinanti organici con rivelatore a cattura di elettroni è rappresentato dagli esteri ftalici. Essi vengono aggiunti in varie percentuali nei comuni materiali plastici flessibili dai quali sono facilmente estratti con conseguente produzione di picchi interferenti nel gascromatogramma. È quindi necessario evitare l'uso di materiali in plastica (controllare anche le guarnizioni dei tappi; debbono essere sempre in teflon). Questi composti hanno vastissima diffusione ambientale e possono inoltre provenire dallo stesso laboratorio ove vengono effettuate le analisi. Può essere inoltre necessaria una purificazione dei solventi per distillazione, di alcuni reagenti per trattamento in muffola e della vetreria per lavaggio con solventi, al fine di eliminare una contaminazione di fondo. Con la purificazione per cromatografia su gel di silice suggerita in questo metodo gli ftalati vengono eliminati dall'estratto e quindi non costituiscono interferenza nella successiva determinazione dei PCB. Gli ftalati infine non danno interferenza se si adotta la tecnica della perclorazione.

Altra sostanza che può causare seria interferenza è lo zolfo; la sua presenza in elevata concentrazione può portare alla saturazione del rivelatore a cattura di elettroni o, in bassa concentrazione, alla presenza di tre o più picchi che possono interferire nell'analisi del tracciato gascromatografico.

Altra interferenza da prendere in seria considerazione è quella dovuta ai pesticidi clorurati ed in particolare al p,p'-DDT ed ai suoi principali prodotti di degradazione. Tale interferenza può essere eliminata con la tecnica di Snyder e Reinert, modificata da Leoni. Anche in questo caso l'adozione della tecnica della perclorazione porta alla eliminazione dell'interferenza. Per ulteriori considerazioni si può fare riferimento all'analogo paragrafo della Sezione 5090 "Pesticidi clorurati".

Anche i polibromobifenili (PBB), in genere utilizzati come ritardanti di fiamma, potrebbero causare interferenza. Per questi composti esistono però scarse informazioni e pochissimi dati in letteratura. Il PBB più noto come ritardante di fiamma ha la sigla PB-6b ed è costituito prevalentemente dal 2,4,5,2',4',5' esabromobifenile. Possono tuttavia essere presenti altri composti (dal pentabromo all'eptabromobifenile) che contribuiscono a dare un gascromatogramma complesso e simile a quello dei PCB. Se nei campioni da analizzare si sospetta, in base al ciclo produttivo dell'azienda, la presenza di PBB è necessaria molta attenzione nell'identificazione dei picchi cromatografici ricorrendo, se disponibile in laboratorio, all'uso del rivelatore di massa (GC/MS).

Infine un'altra interferenza può essere rappresentata da alcuni esteri fosforici. Anche in que-

sto caso tuttavia, adottando la tecnica di purificazione su gel di silice disattivato si può eliminare l'interferenza, poiché questi composti non vengono eluiti nella stessa frazione dei PCB. Per gli esteri fosforici che presentano tempi di ritenzione vicini a quelli dei PCB sulle più comuni colonne gascromatografiche, si possono comunque effettuare controlli analitici mediante gascromatografia con rivelatore fotometrico per il fosforo (FPD) o con rivelatore a ionizzazione di metalli alcalini (NPD).

4. Campionamento e conservazione del campione

I campioni debbono essere prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, della capacità di 1 litro, con chiusura a smeriglio oppure a vite con guarnizione di teflon. Prima del riempimento, le bottiglie (precedentemente lavate in laboratorio con acqua distillata e quindi con esano ed acetone) devono essere risciacquate con la stessa acqua che si desidera campionare. Occorre evitare l'uso di qualsiasi dispositivo in plastica. È buona norma campionare almeno due aliquote per ciascun campione.

Se si sospetta che i campioni così prelevati non siano rappresentativi della composizione dell'effluente, il campionamento dovrà essere effettuato secondo i criteri e le modalità descritte nella Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

I campioni possono essere conservati in frigorifero per una settimana; eventuali degradazioni microbiche possono essere bloccate dall'aggiunta di HCl concentrato (1 mL/L di campione).

5. Apparecchiature

5.1 *Gasromatografo* che consenta l'impiego di colonne capillari.

5.2 *Rivelatori*

Rivelatore di massa (MS) operante in SIM, che consente in alcuni casi l'analisi quantitativa di congeneri non separabili cromatograficamente. Se tale rivelatore non è disponibile si può utilizzare il rivelatore ECD.

5.3 *Sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati cromatografici*

5.4 *Evaporatore rotante*, con possibilità di operare con il vuoto e con bagno termostatico ed opportuno sistema per il recupero dei solventi.

5.5 *Vetreria*

Oltre la normale vetreria in uso nel laboratorio si indicano qui di seguito alcuni elementi indispensabili per l'analisi. Una lista più dettagliata è inclusa nella Sezione 5090.

5.5.1 Colonna in vetro per disidratazione su solfato di sodio anidro (lunghezza=10 cm, d.i.=3,5 cm), senza setto poroso, con gambo sfinato (d.i.=10 mm). Il setto poroso è sostituito da un piccolo batuffolo di cotone sgrassato, opportunamente inserito nel punto di restringimento in fondo alla colonna. In alternativa si possono utilizzare le colonne per la disidratazione in accordo con le specifiche EPA (volume serbatoio=60 mL, lunghezza colonna 10 cm, d.i. 2 cm, gambo sfinato (d.i.=8 mm) (vedi Fig. 2).

5.5.2 Colonna cromatografica in vetro (h=30 cm, d.i.=4,2 mm), con parte inferiore sfinata (h=3,5 cm, d.i.=2 mm) e serbatoio di riserva solventi della capacità di circa 60 mL (vedi Fig. 3).

5.5.3 Fiale o provette da concentrazione in vetro (preferibilmente con gambo sfinato graduato a 0,5 mL ed 1 mL) da 5 mL, 10 mL, 15 mL e 25 mL.

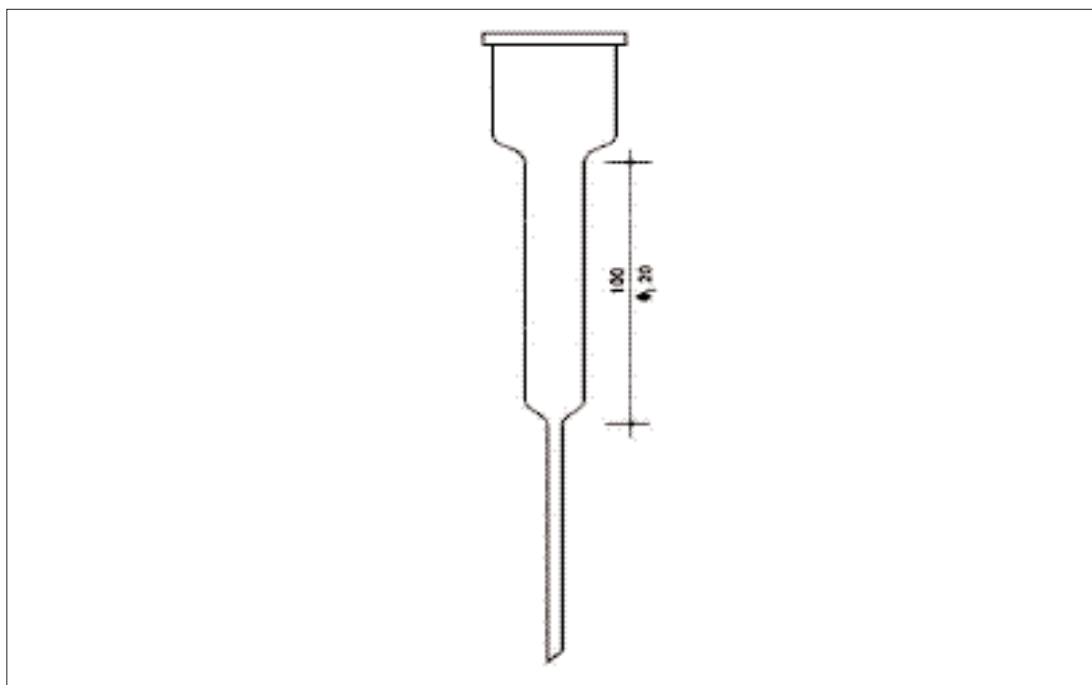


Figura 2: Colonna per disidratazione secondo le specifiche EPA (le misure sono espresse in mm).

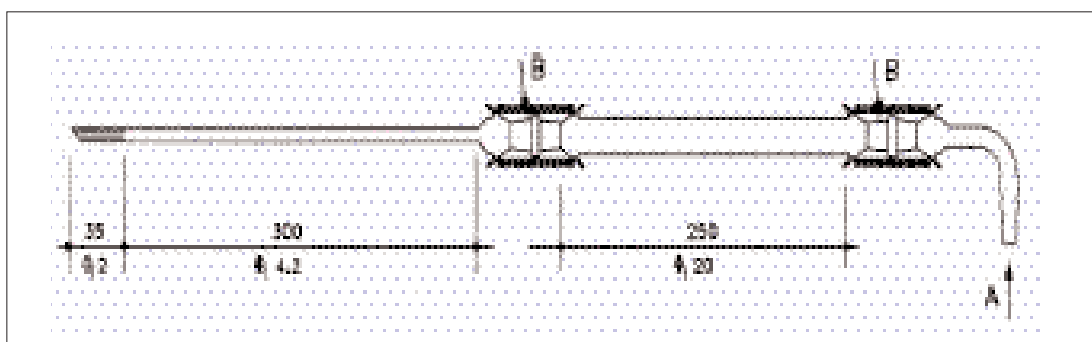


Figura 3: Microcolonna per la separazione di pesticidi ed altri composti in quattro gruppi. A, ingresso aria per ottenere una leggera pressione; B, giunto 10/19 (le misure sono espresse in mm).

5.5.4 Imbuti separatori da 125 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, muniti di tappo a smeriglio e rubinetto in teflon.

5.5.5 Palloni (preferibilmente a cuore) con cono smeriglio adatto per l'evaporatore rotante, di cui al punto 5.4, aventi capacità di 50 mL, 100 mL e 250 mL.

5.5.6 Matracci tarati con tappo smeriglio da 10 mL, 50 mL, 100 mL e 1000 mL.

5.5.7 Pipette graduate di precisione (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL).

5.6 Colonne gascromatografiche

Le colonne e le fasi stazionarie consigliate per l'analisi dei PCB sono descritte nello schema seguente. Si consiglia di utilizzare colonne con rapporto di fase (raggio/2 x spessore di fase) circa 250 e di lunghezza non inferiore a 30 m.

Fase stazionaria	Nomi commerciali fase/colonna
<i>Non polare</i> metil silicone 5%fenilsilicone + 95%metilsilicone	SE-30, DB-1, SPB-1 o <i>equivalenti</i> SPB-5, PTE-5, SE-54, ULTRA-2 o <i>equivalenti</i>
<i>Polare</i> (non dichiarata) cianopropilsilicone stabilizzato	SPB-608 SP-2331 o <i>equivalenti</i>

5.7 *Microsiringhe per gascromatografia* (tipo Hamilton o equivalenti) da 5 e 10 μ L.

5.8 *Bilancia analitica*, risoluzione 0.1 mg.

6. Reattivi

6.1 Solventi

Tutti i solventi, a meno che non siano specificatamente dichiarati "per analisi di pesticidi" vanno sottoposti a purificazione mediante distillazione con apparecchiature "tutto vetro". È consigliabile che per ogni solvente si disponga di un'apposita apparecchiatura di distillazione. Tutti i solventi debbono essere comunque controllati prima di essere utilizzati, usando le quantità impiegate nella procedura, concentrando al volume finale indicato in procedura (generalmente 1 mL) ed analizzandoli in gascromatografia.

6.1.1 n-Esano "per analisi pesticidi"

6.1.2 Diclorometano "per analisi pesticidi"

6.1.3 Acetonitrile "per analisi pesticidi"

6.1.4 Benzene "per analisi pesticidi"

6.1.5 n-Pentano "per analisi pesticidi"

6.1.6 Acetone "per analisi pesticidi"

6.1.7 Toluene "per analisi pesticidi"

6.2 Acqua distillata

Esente da sostanze organiche che possano interferire nelle analisi (esempio: acqua distillata trattata su sistemi dotati di apposita cartuccia a carbone attivo). L'acqua distillata così ottenuta deve essere controllata con una prova di "bianco".

6.3 Acido cloridrico concentrato

6.4 *Solfato di sodio* granulare anidro trattato in muffola a 450°C per almeno 4 ore e conservato in recipiente di vetro (precedentemente lavato con acqua distillata, acetone ed esano ed asciugato) ermeticamente chiuso.

6.5 *Cloruro di sodio* trattato in muffola a 450°C per almeno 4 ore e conservato in recipiente di vetro (precedentemente lavato con acqua distillata, acetone ed esano ed asciugato) ermeticamente chiuso.

6.5.1 Soluzione satura di cloruro di sodio (6.5) in acqua distillata (6.2).

6.5.2 Soluzione al 2% (p/p) di cloruro di sodio (6.5) in acqua distillata (6.2).

6.6 *Cotone sgrassato* in Soxhlet con una miscela n-esano/acetone 1:1 (v/v) per 12 ore, lasciato asciugare e conservato in recipiente di vetro (precedentemente lavato con acqua distillata, acetone ed esano ed asciugato) ermeticamente chiuso.

6.7 *Gel di silice* (secondo specifiche ASTM D-1319-70, 100/200 mesh), trattato in muffola a 200°C per 8 ore e conservato in beuta con tappo a smeriglio (precedentemente lavata con acqua distillata, acetone ed esano e ben asciugata) posta in essiccatore in presenza di agenti essiccanti. Il gel così preparato conserva le sue caratteristiche per circa una settimana, ma è comunque preferibile prepararlo poco prima della analisi.

6.8 *Gel di silice* (ASTM 70/230 mesh), trattato in muffola a 200°C per 8 ore e conservato in beuta con tappo a smeriglio (precedentemente lavata con acqua distillata, acetone ed esano e ben asciugata) posta in essiccatore in presenza di agenti essiccanti. Il gel così preparato conserva le sue caratteristiche per circa una settimana.

6.9 *Acido solforico concentrato*

6.9.1 Gel di silice/acido solforico concentrato 60:40 (p/p)

Mettere in una beuta una quantità esattamente pesata di gel di silice (6.8) ed aggiungere lentamente una quantità di acido solforico concentrato tale da avere un rapporto finale in peso: gel di silice/acido solforico 60:40. Tappare con cura la beuta ed agitare vigorosamente fino a completa scomparsa di grumi o disomogeneità evidenti. Tutte le operazioni vanno eseguite con la massima cautela, sotto cappa e con adeguate protezioni, in considerazione della pericolosità di un acido forte concentrato supportato su una sostanza molto fine e quindi facilmente disperdibile in aria.

6.10 *Agente silanizzante*

Soluzione al 10% di dimetildiclorosilano in toluene.

6.11 *Sodio solfito anidro*

6.12 *Sodio idrossido*

6.13 *Allumina basica* tipo 90 (attività II-III, 70-230 mesh), trattata a 250°C per 6 ore e conservata in beuta con tappo a smeriglio, posta in essiccatore in presenza di agenti essiccanti.

6.14 *Agente desolforante*

Sciogliere 9 g di solfito di sodio ed 1 g di idrossido di sodio in un volume sufficiente di acqua distillata (6.2). Estrarre la soluzione due volte in imbuto separatore con un piccolo volume di esano, per rimuovere le eventuali sostanze organiche ed aggiungerla lentamente a 79 g di allumina basica (6.13) in una beuta con tappo a smeriglio (precedentemente lavata con acqua distillata, acetone ed esano, ben asciugata ed esattamente pesata), agitando per garantire la migliore distribuzione. Tappare la beuta ed agitarla manualmente fino a che non è stata eliminata la presenza di grumi nell'allumina. Porre quindi la beuta aperta in stufa e portare (per essiccamento) il contenuto ad un peso finale di 100 g in modo da avere una percentuale di acqua pari all'11% (allumina: 79 g, sodio solfito: 9 g, sodio idrossido: 1 g, acqua: 11 g).

6.15 *Reattivi per perclorazione*

6.15.1 Cloroformio "per analisi pesticidi" (valgono le stesse considerazioni fatte al punto 6 per gli altri solventi).

6.15.2 Acido cloridrico 6 M

6.15.3 Sodio bicarbonato, soluzione al 10% in acqua distillata

La soluzione deve poi essere estratta in imbuto separatore con due aliquote da 50 mL di esano per 500 mL di soluzione), per eliminare le sostanze organiche eventualmente presenti che potrebbero causare interferenze.

6.15.4 Pentacloruro di antimonio

Il prodotto deve essere di elevata purezza. È infatti possibile che contenga tracce di SbBr_5 ed in questo caso durante la perclorazione (ad esempio dei PCB) si può formare insieme al decaclorobifenile anche il nonacloromonobromobifenile. È quindi necessario effettuare prove preliminari di perclorazione e scartare le confezioni di pentacloruro di antimonio contaminate.

6.15.5 Carbuco di silicio in granuli (circa 20 mesh)

6.16 Soluzioni di riferimento

È opportuno dotare il laboratorio di soluzioni di riferimento delle più comuni miscele di PCB (Aroclor 1016, 1221, 1232, 1242, 1248, 1254 e 1260 o equivalenti). In genere è sufficiente acquistare gli Aroclor 1242, 1254 e 1260 per garantire un'analisi che tenga conto dei principali congeneri nel campione. Se la procedura che si intende utilizzare include la trasformazione dei PCB in decaclorobifenile (DCB) è necessario procurarsi anche un riferimento di questo composto. Per un'analisi completa, secondo le indicazioni di legge, occorre fornirsi anche di miscele di riferimento di PCT disponibili in commercio, anche se, come già detto, la presenza di questi composti nel campione è assai poco probabile. È opportuno inoltre disporre di riferimenti dei pesticidi clorurati indicati nel metodo specifico (5090), per la verifica delle eventuali interferenze derivate da questi composti. Infine, se si intende procedere alla identificazione dei congeneri presenti in quantità significative, è necessario acquistare i riferimenti dei singoli congeneri.

6.16.1 Soluzioni concentrate di PCB

Pesare 0,01 g di miscela di riferimento pura di PCB (esempio Aroclor 1260), trasferirli in un matraccio tarato da 50 mL con n-esano e portare a volume sempre con n-esano (concentrazione finale di circa 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le soluzioni devono essere conservate in frigorifero a 4°C e le eventuali variazioni dovute alla evaporazione del solvente possono essere controllate periodicamente per pesata. Le soluzioni di riferimento di PCB in genere restano inalterate per lunghi periodi (almeno 6 mesi).

6.16.2 Soluzioni diluite di PCB

Preparare dette soluzioni diluendo opportunamente le soluzioni concentrate in modo da avere concentrazioni di circa 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.16.3 Soluzioni di riferimento di PCT

Vale la stessa procedura di preparazione delle soluzioni concentrate e diluite dei PCB.

6.16.4 Soluzioni di riferimento cumulative

6.16.4.A Soluzione di riferimento di miscele di PCB (esempio Aroclor) 1242, 1254 e 1260.

Prelevare opportune aliquote di soluzioni concentrate (6.16.1) e portare a volume in matraccio tarato da 50 mL con n-esano in modo da ottenere per i singoli Aroclor le concentrazioni di cui al punto 6.16.2. Le soluzioni cumulative così preparate sono utili per il controllo della tecnica di perclorazione e per avere orientamenti sulla eventuale presenza di miscele ben definibili (esempio Aroclor 1242, 1254, ecc.) nel campione in analisi.

6.16.4.B Soluzioni di riferimento di miscele di PCT

Procedere con gli stessi criteri del punto precedente.

6.16.4.C Soluzioni di riferimento di miscele PCB+PCT

Prelevare opportune aliquote di soluzioni concentrate (6.16.1 e 6.16.3) e portare a volume in matraccio tarato da 50 mL con n-pentano in modo da ottenere le concentrazioni di cui al punto 6.16.2 (esempio 5 µg/mL di Aroclor 1242 e 5 µg/mL di Aroclor 5442). Queste soluzioni debbono essere impiegate per il controllo dell'efficacia della separazione cromatografica dei PCB dai PCT, su colonna di gel di silice.

6.16.5 Soluzioni concentrate dei singoli congeneri dei PCB

Pesare 0,01 g di riferimento puro del singolo congenere e solubilizzarlo in n-esano portando a volume in un matraccio tarato da 50 mL (concentrazione finale di circa 200 µg/mL). Le soluzioni devono essere conservate in frigorifero e le eventuali variazioni dovute alla evaporazione del solvente possono essere controllate periodicamente per pesata. Le soluzioni di riferimento di PCB in genere restano inalterate per lunghi periodi (almeno 6 mesi).

6.16.6 Soluzioni diluite dei singoli congeneri dei PCB

Preparare dette soluzioni diluendo opportunamente le soluzioni concentrate (6.16.5) in modo da avere concentrazioni di circa 0,50 µg/mL, 0,10 µg/mL e 0,02 µg/mL.

6.16.7 Soluzioni concentrate di PCB e PCT in acetone

Preparare le soluzioni seguendo le modalità indicate nei punti (6.16.1, 6.16.3 e 6.16.5) sostituendo il n-esano con l'acetone.

6.16.8 Soluzioni diluite di PCB e PCT in acetone

Diluire opportunamente le soluzioni di riferimento (6.16.7), in modo da ottenere, per i vari composti, concentrazioni finali di circa 20 µg/mL. Per effettuare prove di recupero aggiungere ad 1 L di acqua 0,1 mL del riferimento prescelto.

6.16.9 Soluzione concentrata di bifenile (p.m. 154,2) in cloroformio

Sciogliere 0,01 g di bifenile in cloroformio e portare quindi a volume in matraccio tarato da 100 mL (concentrazione finale circa 100 µg/mL).

6.16.10 Soluzione diluita di bifenile in cloroformio

Diluire opportunamente la soluzione (6.16.9), in modo da ottenere una concentrazione finale di 3,09 µg/mL (equivalente a 10 µg/mL come DCB). Questa soluzione può essere utilizzata per controllare la riproducibilità della perclorazione.

6.16.11 Soluzione concentrata di bifenile (p.m. 154,2) in n-esano

Sciogliere 0,01 g di bifenile in n-esano e portare quindi a volume in matraccio tarato da 50 mL (concentrazione finale circa 200 µg/mL).

6.16.12 Soluzioni diluite di bifenile in n-esano

Diluire opportunamente la soluzione 6.16.11 in modo da ottenere soluzioni diluite a concentrazioni di circa 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 2 µg/mL.

6.16.13 Soluzioni concentrate di tetradicloroterfenile (TDCT) (o,m,p; p.m. 712,6) in n-esano

Usare per i tre TDCT la stessa procedura indicata in (6.16.1) per ottenere soluzioni a concentrazione di circa 200 µg/mL.

6.16.14 Soluzioni diluite di TDCT in n-esano

Diluire opportunamente le soluzioni 6.16.13 in modo da ottenere le corrispondenti soluzioni di riferimento secondarie dei singoli TDCT a concentrazioni di 1 µg/mL ed una soluzione cumulativa (o+m+p) avente, per ogni composto, la concentrazione di 1 µg/mL. Queste soluzioni si impiegano per le determinazioni gascromatografiche dei TDCT.

6.16.15 Soluzioni di aldrina in n-esano

Seguire la procedura utilizzata in (6.16.5 e 6.16.6). La soluzione diluita a concentrazione di 0,1 µg/mL può essere usata per il controllo della sensibilità del rivelatore a cattura di elettroni.

6.16.16 Soluzioni di p,p'-DDT (ed eventualmente di altri pesticidi clorurati) in n-esano

Seguire la procedura utilizzata in (6.16.5 e 6.16.6). Le soluzioni diluite possono essere utilizzate per il controllo del frazionamento per cromatografia su gel di silice.

7. Procedimento

7.1 *Trattamento preliminare*

Se il campione è stato refrigerato, attendere che si equilibri a temperatura ambiente prima dell'estrazione. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire la migliore omogeneità.

7.2 *Estrazione*

Trasferire 500 mL (od un volume minore) di campione in un imbuto separatore da 1 L, aggiungere 60 mL (ridurre a 20-30 mL ed usare un imbuto separatore da 250 mL, se il volume di campione prelevato è di 100 mL) di miscela di diclorometano/n-esano 15:85 (v/v) ed agitare vigorosamente per almeno 3 minuti. Attendere la separazione tra le due fasi. Nel caso di formazione di emulsione, aggiungere una soluzione satura di cloruro di sodio (50-100 mL), agitare ed attendere; se la quantità di emulsione rimane comunque elevata (volume di emulsione pari ad un terzo o più della fase organica) centrifugare o filtrare su lana di vetro. Scaricare la fase acquosa (fase inferiore) in un secondo imbuto separatore e raccogliere la fase organica (fase superiore) per percolazione in colonna di disidratazione su sodio solfato anidro (circa 30 g) in un pallone da 250 mL. Ripetere l'estrazione con due successive aliquote di 60 mL della stessa miscela di solventi, raccogliendo le fasi organiche disidratate su sodio solfato anidro sempre nello stesso pallone da 250 mL. Lavare il sodio

solfo con circa 20 mL di n-esano che vengono raccolti insieme alle altre fasi organiche. Concentrare a piccolo volume (circa 5 mL) mediante evaporatore rotante dotato di bagno termostatico, alla temperatura di 45°C e sotto vuoto moderato (400 mm Hg). Trasferire quantitativamente l'estratto concentrato in una provetta da concentrazione aiutandosi con la minima quantità necessaria di n-esano per i lavaggi del pallone, aggiungere 1 mL di iso-ottano e concentrare sotto flusso di azoto a circa 1 mL, assicurandosi della completa eliminazione del diclorometano.

7.3 Purificazione

Di seguito sono descritte le tecniche di purificazione più idonee per l'eliminazione delle più probabili interferenze. L'analista dovrà decidere se sottoporre l'estratto ad una o più di una delle seguenti procedure. Si consiglia comunque di sottoporre sempre l'estratto alla ripartizione con acetonitrile.

7.3.1 Ripartizione con acetonitrile

Questa procedura è utilizzata per separare grassi ed oli dall'estratto. Trasferire quantitativamente l'estratto in un imbuto separatore da 125 mL con un volume di n-esano sufficiente ad avere un volume finale nell'imbuto di 15 mL. Estrarre il campione per quattro volte con 30 mL di acetonitrile saturo di esano, agitando ogni volta vigorosamente per almeno 3 minuti. Riunire le fasi acetonitriliche in un imbuto separatore da 1000 mL già contenente 700 mL di una soluzione di NaCl al 2%. Mescolare ed estrarre con due aliquote successive di 100 mL di n-esano, agitando vigorosamente ogni volta per almeno 3 minuti. Riunire gli estratti esanici in un imbuto separatore da 1000 mL e lavare con due aliquote successive di 100 mL di acqua distillata. Scartare le acque di lavaggio e disidratare l'esano su solfato di sodio anidro in apposita colonna di disidratazione. Lavare l'imbuto separatore e il sodio solfato con tre porzioni di 10 mL di n-esano, riunendole all'estratto esanico. Concentrare in evaporatore rotante a volume noto (≤ 10 mL) ed analizzare in gascromatografia. Se è necessario procedere con altre tecniche di purificazione, ridurre prima il volume sotto flusso di azoto fino a 1 mL.

7.3.2 Rimozione dello zolfo elementare

È consigliabile adottare questa purificazione anche se si sospetta una interferenza molto lieve. Riempire una colonna cromatografica (5.5.2) con 7 g di agente desolforante (6.14), trasferire quantitativamente l'estratto concentrato in testa alla colonna ed eluire con 25 mL di esano. Concentrare l'eluato in evaporatore rotante a volume noto (≤ 10 mL) ed analizzare in gascromatografia. Se è necessario procedere con altre tecniche di purificazione, ridurre prima il volume, sotto flusso di azoto, fino a 1 mL.

7.3.3 Cromatografia su gel di silice attivato

L'estratto purificato può essere sottoposto a cromatografia su gel di silice attivato per la separazione dei PCB dai PCT.

7.3.3.A Taratura dell'adsorbente

La cromatografia su gel di silice attivato (100-200 mesh) (6.7) viene effettuata per completare il procedimento di purificazione dell'estratto e per ottenere la separazione dei PCB dai PCT in due frazioni in modo da facilitarne l'identificazione gascromatografica.

È opportuno che ogni lotto di gel di silice ricevuto sia controllato per la riproducibilità della separazione secondo il procedimento seguente: da un lotto di gel di silice, conservato in un recipiente di vetro ermeticamente chiuso, prelevarne 60-80 g ponendoli in una larga capsula di porcellana e mantenerli in una stufa ad aria a 200°C per 8 ore (per l'attivazione dell'adsorbente è opportuno impiegare una stufa ad aria diversa da quella che si utilizza per il trattamento della vetreria). Il gel così attivato va conservato, in recipienti di vetro ermetica-

mente chiusi, in essiccatore e normalmente conserva le sue caratteristiche per 10-15 giorni. Nella parte inferiore della colonna cromatografica (5.5.2) pressare un batuffolo di lana di quarzo ed immettere 20 mL di n-pentano (chiudendo la parte inferiore della colonna) e poi 4 g di gel di silice attivato. Chiudere con un tappo a smeriglio la parte superiore della colonna, rovesciarla 2-3 volte e far depositare il gel di silice in modo da evitare la formazione di bolle d'aria. Iniziata la discesa del solvente, con piccoli quantitativi di n-pentano lavare le pareti della colonna per trasportare in basso tutto il gel di silice e successivamente, non appena il livello del solvente sta per raggiungere quello superiore dell'adsorbente, immettere nella colonna 2 mL del riferimento (in n-pentano) di PCB+PCT e far adsorbire. Collegare il serbatoio riserva solventi ed eluire con 130 mL di n-pentano e, successivamente, con 60 mL di benzene.

Il flusso dei solventi deve essere di circa 2-3 mL/minuto e può essere ottenuto applicando una lieve pressione nella colonna. Al termine della cromatografia concentrare le due frazioni in evaporatore rotante fino a pochi millilitri e portarle quasi a secchezza con debole flusso di azoto, a temperatura ambiente. Portare infine a un volume noto con n-esano ed esaminare i due eluati concentrati mediante gascromatografia. Per il corretto uso della colonna cromatografica l'efficacia della separazione (PCB nella prima frazione, PCT nella seconda) dovrebbe essere almeno del 95%. Se non si ottiene questo risultato variare opportunamente i volumi degli eluenti.

7.3.3.B Cromatografia del campione

Prima di procedere alla cromatografia su colonna del campione da analizzare, è opportuno ricavare almeno un tracciato gascromatografico complessivo dell'estratto diluito per avere un'idea orientativa delle sostanze presenti e delle loro quantità approssimative. Infatti, in caso di campioni molto contaminati l'estratto deve essere opportunamente diluito e la cromatografia su colonna effettuata su un'aliquota della soluzione risultante dalla diluizione. Usando la stessa tecnica utilizzata per la taratura dell'adsorbente immettere nella colonna cromatografica la soluzione di 2 mL in n-pentano del campione in analisi e far adsorbire; quindi effettuare due lavaggi del contenitore, ognuno con 2 mL di n-pentano e far adsorbire anche queste quantità.

Eluire poi con n-pentano (130 mL) e benzene (60 mL), oppure con i volumi più opportuni determinati nelle prove di controllo dell'adsorbente (utilizzare sempre contenitori separati per ciascun solvente al fine di non alterare la polarità). Il flusso dei solventi deve essere di circa 2-3 mL/minuto e può essere ottenuto applicando una lieve pressione nella colonna. Al termine della cromatografia concentrare le due frazioni in evaporatore rotante fino a pochi millilitri e portare quasi a secchezza con debole flusso di azoto, a temperatura ambiente. Portare infine a volume noto con n-esano ed esaminare i due eluati concentrati mediante gascromatografia.

7.3.4 Procedura semplificata di purificazione (trattamento con acido solforico e silice)

In considerazione della resistenza dei PCB a trattamenti con acido concentrato, spesso, specialmente per matrici biologiche, i metodi riportati in letteratura riportano la metodica descritta di seguito, che può essere utilizzata anche per il trattamento di estratti di acqua di scarico, consentendo una sufficiente purificazione dell'estratto stesso. Con questo trattamento si perdono per degradazione chimica alcuni pesticidi clorurati, ma per la determinazione dei soli PCB questo non costituisce un problema.

Trasferire l'estratto esanico concentrato (circa 1 mL) in provetta da reazione, lavando con altre piccole aliquote di esano. Aggiungere 1 mL di acido solforico concentrato, chiudere accuratamente la provetta ed agitare vigorosamente. Separare le due fasi (preferibilmente per centrifugazione) e prelevare la fase esanica concentrandola ad 1 mL. Una ulteriore purificazione si può ottenere trasferendo l'estratto trattato con acido solforico su una colonna cromatografica (5.5.2) riempita con 3 g di silice (6.8) ed eluendo con 20 mL di una miscela esano/benzene 95:5 (v/v). L'eluato, concentrato al volume desiderato, viene analizzato per gascromatografia. In alternativa, la procedura descritta può essere semplificata trasferendo l'estratto esanico del campione in testa ad una colonna cromatografica (5.5.2) riempita con 10 g di silice/acido solforico 60:40 (p/p) (6.9.1) ed eluendo con 30 mL di esano. L'eluato, concentrato al volume desiderato, viene analizzato per gascromatografia.

Nota: le procedure di purificazione indicate in questo paragrafo rappresentano una alternativa a quelle descritte in precedenza e sono relativamente più semplici e rapide. La letteratura scientifica ne riconosce la validità e, se l'analisi è limitata ai soli PCB, possono essere adottate senza problema.

7.4 Tecniche di perclorazione

7.4.1 Perclorazione dei PCB a DCB (decaclorobifenile)

7.4.1.A Controllo dell'efficacia della perclorazione

L'efficacia della perclorazione (resa % della conversione dei PCB a DCB) può essere controllata sia a partire da soluzioni di riferimento di diversi Aroclor (6.16.2) o da loro miscele a concentrazione nota (6.16.4.A), sia a partire da una soluzione di riferimento di bifenile (6.16.10). La perclorazione del solo bifenile, essendo più rapida di quella dei PCB, è utile anche per controllare il grado di purezza del pentacloruro di antimonio impiegato (assenza del corrispondente pentabromuro).

7.4.1.B Perclorazione dei PCB

Immettere in ogni tubo per perclorazione (Fig. 4) volumi di 1-2 mL delle soluzioni di riferimento in n-esano di PCB calcolando i quantitativi teoricamente equivalenti di DCB (si può procedere, ad esempio, secondo uno schema simile a quello riportato in Tab. 4). Aggiungere ad ogni tubo da perclorazione 2 granelli di carburo di silicio (6.15.5) e 4-5 gocce di cloroformio concentrando poi su bagno ad acqua, con cautela, a circa 0,1 mL (attenzione alla fuoriuscita dei solventi per ebollizione). Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, aggiungere 2 mL di cloroformio e concentrare ancora a 0,1 mL; raffreddare e ripetere un'altra volta questo procedimento. Occorre porre attenzione a tali fasi di evaporazione che portano anche ad eliminare il bifenile eventualmente presente nel campione. Se il campione è perclorato, è possibile falsare completamente il dosaggio dei PCB.

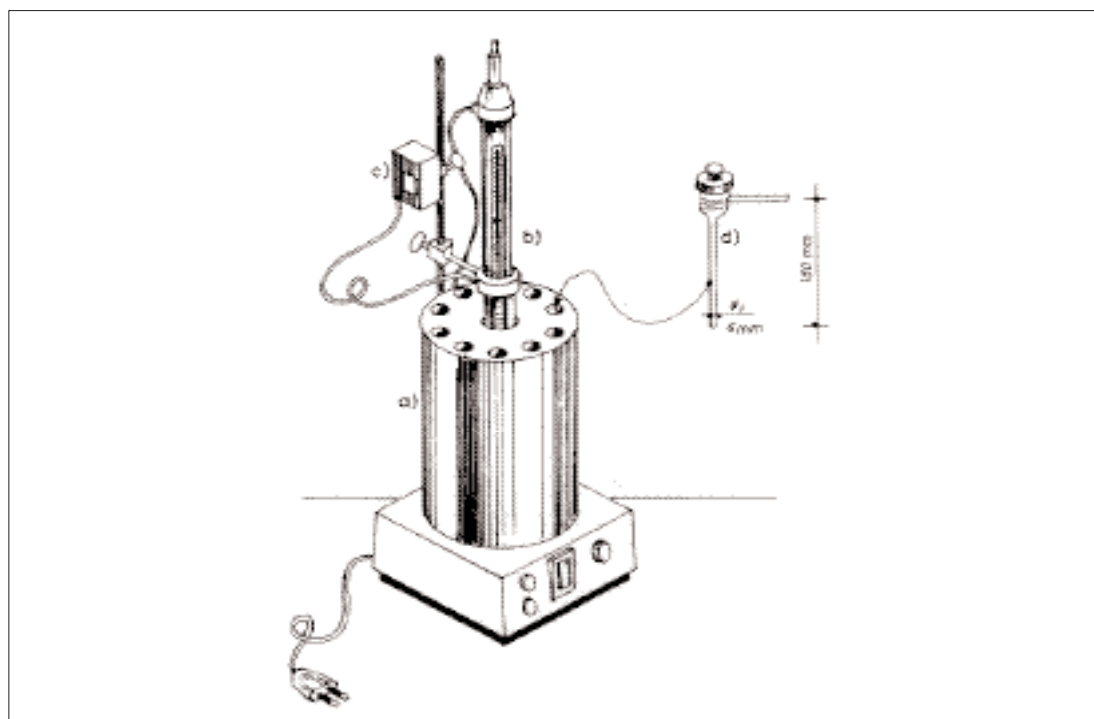


Figura 4: Tubo di perclorazione e blocco riscaldante. a) blocco di alluminio; b) termometro immerso in bagno di paraffina; c) "relais"; d) tubo di perclorazione.

Tabella 4: Valutazione dell'efficacia della perclorazione per la conversione dei PCB a DCB*

Miscele di PCB perclorate in µg			Equivalenti teorici in µg	DCB ottenuto % del teorico** µg
Fenclor42	Fenclor 54	Fenclor 60		
10,7	-	-	20,8	87,7
-	10,3	-	15,8	94,5
-	-	10,6	14,7	92,7
3,6	3,4	3,5	17,2	114,4
3,6	1,7	5,3	16,9	108,7
3,6	5,2	1,8	17,4	92,7
5,4	1,7	3,6	18,0	103,5
1,8	3,4	5,3	16,0	82,8
1,8	5,2	3,6	16,4	105,9

(*) Calcoli effettuati sulla base dei seguenti pesi molecolari medi stimati: Fenclor 42 = 257,5; Fenclor 54 = 326,4; Fenclor 60 = 361

(**) Valore medio = 98,1 µg; scarto tipo = 10,5 µg; minimo e massimo = 82,8 µg e 114,4 µg

Immettere nei tubi di perclorazione, (sotto cappa), circa 0,2 mL di pentacloruro di antimonio (6.15.4); chiudere ermeticamente con le apposite valvole e lasciare per 15-18 ore nel bagno a secco a 175-180°C. Terminata la perclorazione, lasciar raffreddare prima a temperatura ambiente e poi, per qualche minuto, in bagno a ghiaccio procedendo poi, sotto cappa, all'apertura della valvola del tubo. Trasferire quantitativamente il campione perclorato in un imbuto separatore da 60 mL riprendendo con 5 mL di HCl 6 M (6.15.2) e poi con 15 mL di n-esano (6.1.1). Agitare e lasciare separare le fasi, immettendo quella acida in un altro imbuto separatore e procedendo ad altre due estrazioni, ogni volta con 15 mL di n-esano.

Sottoporre gli estratti riuniti di n-esano ai seguenti lavaggi: per due volte con 20 mL di acqua distillata, poi con 20 mL di NaHCO₃ al 10% (6.15.3) ed infine per due volte con 20 mL di acqua distillata, scartando sempre le soluzioni di lavaggio. Filtrare la soluzione di n-esano su una colonna per disidratazione (5.6.1) contenente circa 10 g di Na₂SO₄ anidro (6.4) e, al termine, lavare l'imbuto separatore e la colonna con 60-70 mL di n-esano, riunendo le soluzioni. Concentrare le soluzioni riunite ad 1 mL, mediante l'apposito evaporatore rotante e sotto vuoto leggero, per le successive determinazioni gascromatografiche del DCB.

7.4.1.C Perclorazione del bifenile

La resa esatta della perclorazione può essere controllata a partire da quantità note di bifenile in cloroformio, immettendo nel tubo da perclorazione 0,1 mL della soluzione di riferimento diluita di bifenile.

In questo caso non si deve procedere alle successive diluizioni ed evaporazioni della soluzione, procedendo senz'altro con l'aggiunta del pentacloruro di antimonio e quindi con la reazione ed i lavaggi come riportato sopra e con la valutazione gascromatografica del DCB.

7.4.1.D Perclorazione del campione

La prima frazione di eluizione del gel di silice (7.3.3.B) (che contiene i PCB), evaporata e ripresa con un 1 mL di n-esano, viene immessa nel tubo per perclorazione e quindi trattata esattamente come descritto in 7.4.1.B (perclorazione dei PCB). Procedere quindi ai lavaggi ed all'analisi gascromatografica.

7.4.2 Perclorazione dei PCT a TDCT (o, m, p)

7.4.2.A Controllo dell'efficacia della perclorazione

Come già visto per i PCB, anche in questo caso l'efficacia della perclorazione può essere controllata a partire da soluzioni di riferimento di PCT. La perclorazione e l'isolamento dei TDCT vengono effettuate in modo completamente analogo a quanto già descritto in 7.4.1.A) e la

resa di conversione a TDCT è normalmente superiore al 95%. Poichè i PCT sono costituiti da miscele dei tre isomeri del terfenile (o, m, p), presenti approssimativamente nel rapporto 1:4:2, in tale rapporto orientativo si rinverranno anche i tre isomeri TDCT che verranno valutati mediante gascromatografia.

7.4.2.B Perclorazione del campione

La seconda frazione di eluizione del gel di silice (7.3.3.B) (che contiene i PCT), evaporata e ripresa con 1 mL di n-esano viene immessa nel tubo per perclorazione e quindi trattata esattamente come descritto in 7.4.1.A) (perclorazione dei PCB). Procedere quindi ai lavaggi e all'analisi gascromatografica.

7.5 *Determinazioni gascromatografiche*

Si consiglia di utilizzare una colonna capillare con fase non polare ed un rivelatore di massa, o in assenza di questo, di un rivelatore e cattura di elettroni (ECD).

Si riportano di seguito le condizioni operative e, a titolo di esempio, i relativi cromatogrammi ottenuti con alcune delle colonne consigliate (Figg. 5A-E, 6A-C). Ovviamente i dati riportati sono indicativi e l'analista deve verificare i parametri con la strumentazione e le condizioni operative effettivamente utilizzate.

Per la verifica della riproducibilità della risposta del rivelatore, ripetere almeno tre volte l'iniezione di una sostanza di riferimento (esempio: aldrina).

7.6 *Determinazione gascromatografica con rivelatore di massa*

L'uso della GC/MS per l'analisi quantitativa dei PCB presenta delle caratteristiche peculiari:

- possibilità di distinguere fra livelli di clorurazione differenti;
- maggiore uniformità dei fattori di risposta all'interno delle classi isomeriche in confronto con quanto avviene con il rivelatore ECD;
- maggiore sensibilità per i congeneri a basso livello di clorurazione (contrariamente all'ECD, la cui risposta è ovviamente funzione del numero e posizione degli atomi di cloro).

L'uso della GC/MS consente quindi una semplificazione nel riconoscimento dei singoli isomeri, generando di converso una notevole mole di dati (spettri di massa) che necessita di adeguati mezzi e metodi di trattamento.

Nella letteratura più recente è possibile reperire informazioni dettagliate sul comportamento cromatografico dei PCB su molte colonne capillari così come diversi schemi di acquisizione ed interpretazione dei dati. In linea teorica è possibile l'identificazione di tutti i congeneri con l'uso di adeguati programmi di temperatura e di tecniche di accoppiamento di due colonne a polarità differente. È inoltre oggi possibile reperire il riferimento di ogni congenere e quindi, sempre in linea teorica, operare una analisi quantitativa molto accurata. D'altra parte questo livello di dettaglio, se può essere di estremo interesse per indagini sul destino ambientale dei PCB, è sicuramente eccessivo per analisi di controllo di acque di scarico, soprattutto in considerazione dei tempi di analisi e dei costi conseguenti. Il sistema analitico più adeguato alle esigenze della presente metodica prevede comunque l'uso di una colonna capillare non polare (tipo SE-54) e di una soluzione il riferimento di congeneri (ad esempio quella riportata per i metodi EPA 525 o 625) contenente un singolo congenere per ogni classe isomerica, scelto in modo da rappresentare adeguatamente il valore medio del fattore di risposta per la classe isomerica rappresentata. In questo caso la scelta oculata nonché ovviamente la purezza delle soluzioni di riferimento usate è maggiormente critica rispetto all'utilizzazione di miscele di Aroclor commerciali.

La tecnica di acquisizione dei dati è generalmente SIM (Selected Ions Monitoring), in cui vengono misurati soltanto alcuni valori di m/z caratteristici delle sostanze di interesse.

La modalità di frammentazione dei congeneri dei PCB in condizioni di impatto elettronico (EI)

è piuttosto semplice. Il "cluster" isotopico dello ione molecolare è comunque il più abbondante, seguito da quello relativo alla perdita di due atomi di cloro (ovviamente a partire dai diclorurati). Per i congeneri aventi due o più atomi di cloro adiacenti è rilevabile un "effetto orto" con perdita di HCl.

La ionizzazione chimica (CI) in ioni positivi porta alla formazione dello ione molecolare protonato con scarsissima o nulla frammentazione e può risultare utile in presenza di rilevanti quantità di sostanze interferenti. Quella in ioni negativi (NICI), oltre alla scarsa frammentazione, presenta livelli di sensibilità comparabili con l'ECD per i composti con elevata affinità elettronica.

L'analisi dei PCB in acque di scarico mediante GC/MS non presenta particolari problemi di sensibilità, o necessità di utilizzare spettrometri di massa ad alta risoluzione (quali quelli a settore magnetico), come per esempio nell'analisi di diossine. Il tipo di rivelatore di massa più adatto in termini di praticità di utilizzo, facile manutenzione, robustezza e ridotti costi di esercizio è quello a quadrupolo, sia classico che in configurazione "ion-trap", operando in condizioni di ionizzazione per impatto elettronico a 70 eV.

L'acquisizione dei dati in SIM dovrebbe essere ottimizzata sulla base delle informazioni ricavabili in letteratura sul comportamento cromatografico dei PCB. Come precedentemente accennato, la colonna capillare più usata per questa analisi è del tipo metil-5%fenilsiliconico (SE-54 ed equivalenti) ed esistono in commercio miscele di congeneri specificatamente formulate per la definizione delle "finestre" di eluizione delle singole classi isomeriche. Di seguito vengono indicati i primi e gli ultimi congeneri ad essere eluiti per le varie classi isomeriche.

Classe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
primo CB	1	10	19	54	104	155	188	202	208	209
ultimo CB	3	15	37	77	126	169	189	205	206	209

Le possibilità di scelta per le masse da acquisire in SIM sono varie ed esistono in letteratura schemi più o meno complessi in funzione del livello di confidenza desiderato per l'identificazione dei composti e dell'uso più o meno spinto delle informazioni cromatografiche pregresse (es. tRR).

In generale, il requisito minimo è che vengano acquisiti per ogni classe isomerica almeno due valori di m/z dal "cluster" isotopico dello ione molecolare: uno per la quantificazione e l'altro per la conferma della identificazione. In questo caso esiste la possibilità di interferenza positiva da parte di congeneri a più alto livello di clorurazione (in particolare con 2 atomi di cloro in più). Tale interferenza può essere eliminata facendo ricorso ai dati cromatografici noti in letteratura o acquisendo contemporaneamente altri m/z diagnostici: nel primo caso il sistema di interpretazione dei dati sarà dipendente dal sistema cromatografico adottato (con il vantaggio di una relativa semplicità di applicazione), nel secondo caso si avrà un sistema relativamente svincolato dalla parte cromatografica, con la conseguenza di una maggiore complessità interpretativa e di una riduzione di sensibilità (maggior numero di m/z da acquisire contemporaneamente).

In Tab. 4 viene riportato un tipico programma di acquisizione in SIM relativamente ai vari congeneri.

In Fig. 5 sono riportati i cromatogrammi ionici (per classi isomeriche) relativi ad una miscela 1:1:1:1:1 di Aroclor 1016, 1221, 1232, 1242, 1248, 1254. Non essendo presente l'Aroclor 1260 nella miscela sono prevalenti i composti a più basso livello di clorurazione.

Tabella 4: Programma di acquisizione in SIM relativamente ai vari congeneri. Gli intervalli dei tempi di ritenzione riportati sono soltanto indicativi (con riferimento alle condizioni cromatografiche utilizzate)

Intervallo dei tempi di ritenzione (min)	7-12	12-15	15-19	19-26	26-30	30-35	35-40	>40
classi isomeriche	mono/di	di/tri/tetra	tri/tetra/penta	tetra/penta/esa	penta/esa/epta	esa/epta/otta	otta/nona	deca
m/z	188,05	222,00	255,95	289,90	325,90	359,85	427,75	495,70
	190,05	224,00	257,95	291,90	327,90	361,85	429,75	497,70
	222,00	255,95	289,90	325,90	359,85	393,80	431,75	499,70
	224,00	257,95	291,90	327,90	361,85	395,80	461,70	
		289,90	325,90	359,85	393,80	427,75	463,70	
		291,90	327,90	361,85	395,80	429,75	465,70	

7.7 Determinazione gascromatografica con rivelatore ECD

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento che contengano un congenere per ogni classe isomerica, in modo da poter valutare, in prima approssimazione, la risposta del rivelatore in relazione agli atomi di cloro presenti in molecola.

Le concentrazioni delle soluzioni di riferimento utilizzate dovrebbero essere tali che ad 1 μL di soluzione iniettato corrispondano quantità di clorobifenile comprese nell'intervallo 20-500 pg, assunto preliminarmente come intervallo di linearità del rivelatore.

Non è necessario per i PCB determinare la curva di taratura per ogni singolo congenere. È sufficiente che la miscela di taratura contenga un congenere per ogni classe isomerica: la loro risposta può essere considerata rappresentativa dell'intera classe isomerica (anche se la risposta dell'ECD varia anche all'interno della stessa classe isomerica). Alternativamente la curva di taratura si può costruire utilizzando i picchi più rappresentativi di soluzioni di riferimento di PCB (Aroclor 1242, 1254 e 1260).

Scelte le condizioni operative, controllata la stabilità strumentale e la sensibilità del rivelatore si può passare all'analisi gascromatografica del campione estratto ed opportunamente concentrato, in modo che i picchi delle sostanze da analizzare entrino nell'intervallo di linearità. In Fig. 6 sono riportati i relativi gascromatogrammi dell'Aroclor 1254, dell'Aroclor 1260 e di una miscela di Aroclor 1254 + Aroclor 1260.

7.8 Analisi quantitativa

Iniettare 1 μL di estratto purificato e concentrato del campione analizzato. Valutare qualitativamente la presenza di PCB ed identificare orientativamente la miscela (esempio Aroclor 1242, 1254 o 1260) eventualmente presente. Iniettare quindi 1 μL di esano per verificare che non compaiano picchi dovuti a residui dalle precedenti iniezioni. Iniettare 1 μL della soluzione standard della/delle miscele di PCB eventualmente identificate nel campione. La concentrazione della soluzione di riferimento deve essere dello stesso ordine di grandezza della concentrazione valutata nel campione. Iniettare quindi tre volte il campione e successivamente altre due volte la soluzione di riferimento. I policlorobifenili si presentano nei campioni reali in miscele di varia complessità e con una distribuzione dei congeneri non sempre eguale a quella delle soluzioni di riferimento, per cui è impossibile descrivere un metodo semplice per la loro determinazione quali-quantitativa. Si riportano qui di seguito i criteri di base di alcuni dei metodi che possono essere utilizzati.

7.8.1 Caso 1

Il caso in cui è evidente nel campione la presenza di una sola miscela (ad esempio Aroclor 1260) con le stesse percentuali dei diversi congeneri della soluzione di riferimento, è il più semplice che si possa incontrare. In questo caso, si può confrontare il cromatogramma del campione con quello della soluzione di riferimento corrispondente e misurare la somma del-

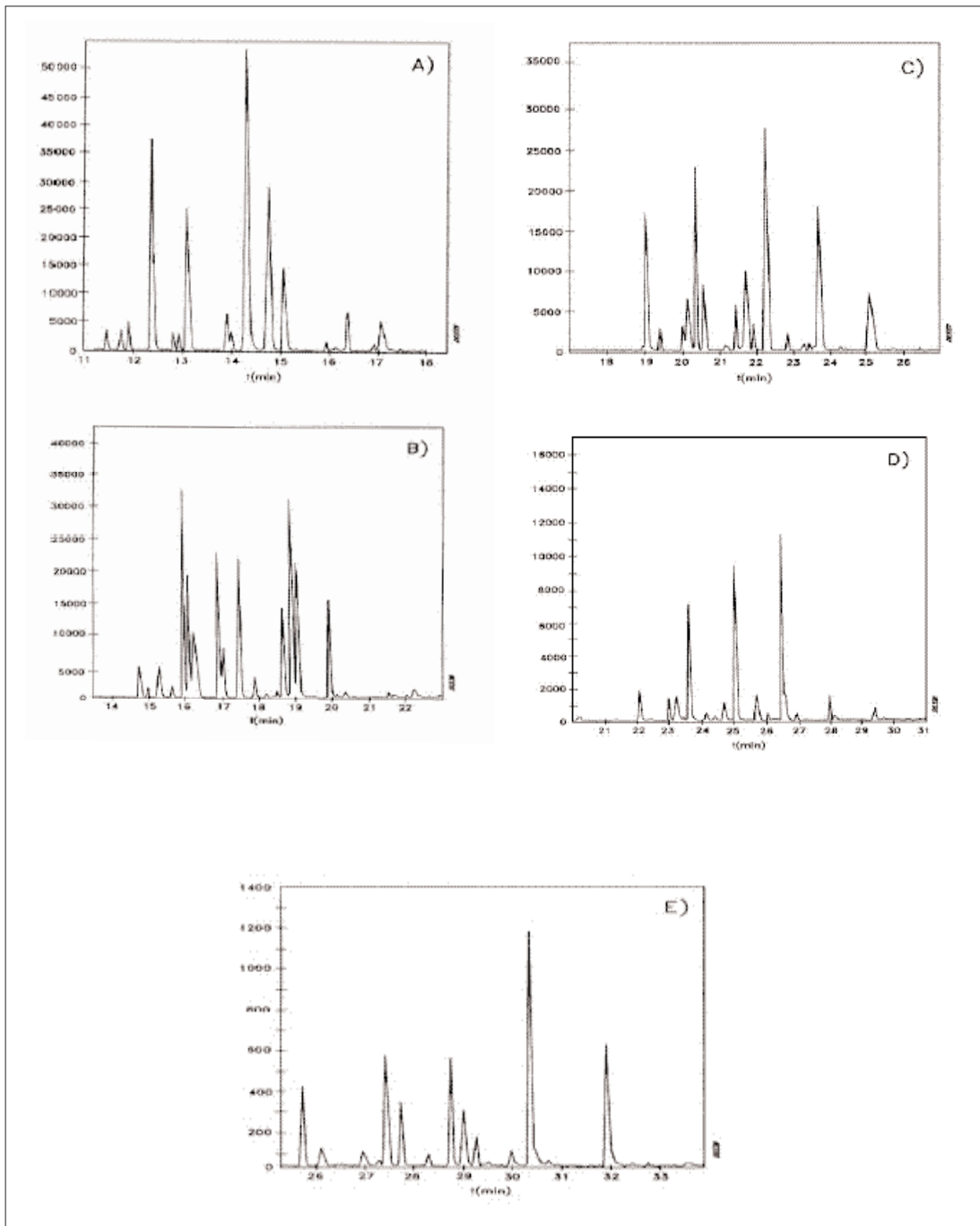


Figura 5: Cromatogrammi ionici relativi a triclorobifenili (A), tetraclorobifenili (B), pentaclorobifenili (C), esaclorobifenili (D) ed eptaclorobifenili (E). Condizioni strumentali: rivelatore di massa quadrupolare con ionizzazione EI a 70 eV; gas di trasporto: elio (120 KPa di pressione in testa alla colonna capillare); colonna: metil-5%fenilsilicone (0,2 mm diametro interno, 0,11 μm spessore di fase, 25 m lunghezza); iniettore: "splitless" (260°C, 1 min); programma di temperatura: 80°C per 2 min, 15°C/min fino a 150°C per 1 min, 3°C/min fino a 260°C; temperatura della linea di trasferimento: 280°C.

le aree dei picchi dei diversi congeneri nel campione e nella soluzione di riferimento, calcolando il risultato nel seguente modo:

$$C = \sum (A_c/A_s) \frac{Q_r \cdot V_r}{V_i \cdot V_e}$$

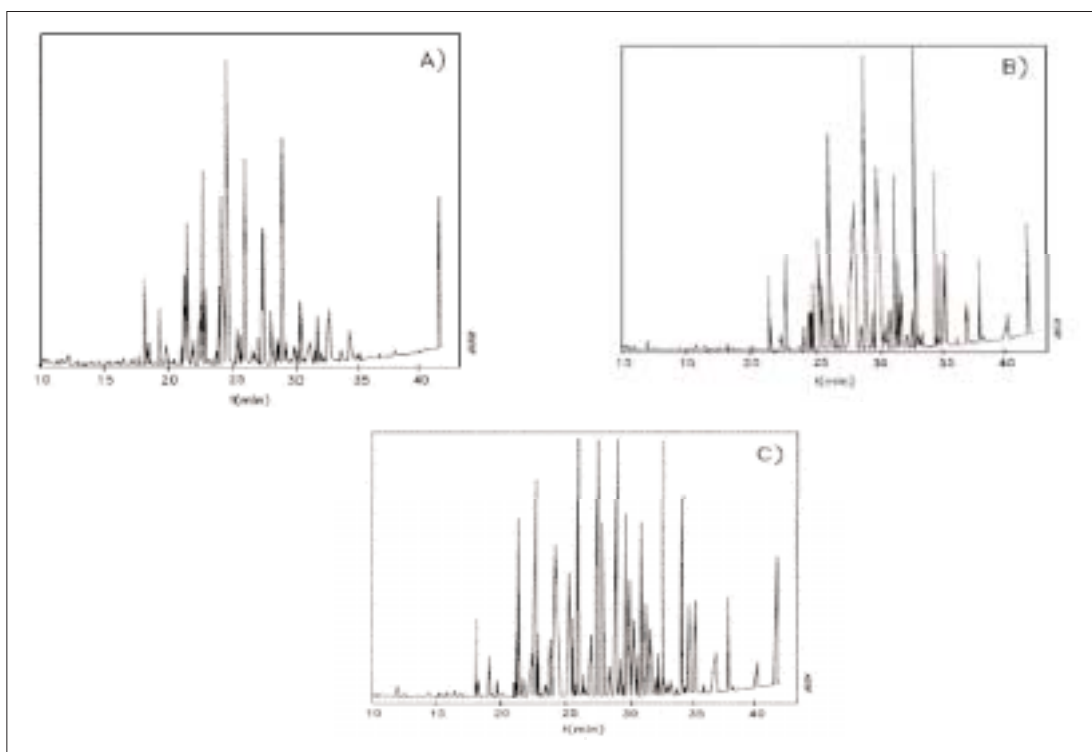


Figura 6: Gascromatogrammi di Aroclor 1254 (A), Aroclor 1260 (B) e di una miscela di Aroclor 1254+Aroclor 1260 (C). Decaclorobifenile addizionato in tutti i campioni su colonna capillare SPB5 (lunghezza: 25 m, d.i. 0,2 mm, spessore del film: 0,25 μm). Condizioni cromatografiche utilizzate: temperatura iniettore 240°C (splitless 1 min); programma di temperatura 80°C per 2 min, quindi fino a 150°C a 15°C/min, 150°C per 1 min e fino a 260°C a 3°C/min; gas di trasporto elio.

dove:

- C = concentrazione ($\mu\text{g/L}$) di PCB;
- A_{s_i} = area del generico picco (i) nel riferimento;
- A_{c_i} = area del corrispondente picco (i) nel campione;
- Q_s = quantità (ng) di soluzione di riferimento iniettata;
- V_f = volume finale (μL) dell'estratto;
- V_i = volume (μL) di campione iniettato;
- V_c = volume (mL) di campione sottoposto all'analisi.

Per il calcolo della concentrazione ("PCB totali") si può procedere anche nel seguente modo. Iniettare una quantità nota di una soluzione di riferimento di una miscela ("Aroclor x"), che si ritiene abbia il tracciato cromatografico più simile a quello del campione. Calcolare i tempi di ritenzione relativi (tRR) rispetto al p,p'-DDE nella soluzione di riferimento. Misurare l'area di ciascun picco e calcolare il fattore di risposta (R) per ogni singolo picco (singolo congenere o somma di congeneri non separabili cromatograficamente) nel seguente modo:

$$R_i = \frac{Q_s \cdot M_i / 100}{A_i}$$

dove:

- R_i = fattore di risposta (ng/area) del/dei congeneri, relativi al picco (i);
- Q_s = quantità (ng) di miscela di riferimento iniettata;
- M_i = media ponderale (%) del/dei congeneri, relativi al picco (i) nella soluzione di riferimento;
- A_i = area del picco (i).

Calcolare i tRR e l'area di ciascun picco nel campione. Confrontare il cromatogramma del campione con quelli della soluzione di riferimento e calcolare la quantità relativa ad ogni picco preso in considerazione:

$$Q(i) = R_i \cdot A_{ic}$$

dove:

Q_i = quantità (ng) relativa al picco (i) considerato;

R_i = fattore di risposta del congenere, relativi al picco (i);

A_{ic} = area del picco nel campione.

Addizionare le quantità (ng) relative a tutti i picchi considerati e calcolare la concentrazione nel campione:

$$C = \frac{\sum Q(i) \cdot V_e}{V_c \cdot V_i}$$

dove:

C = concentrazione ($\mu\text{g/L}$) di PCB;

$\sum Q(i)$ = somma delle quantità relative ad ogni singolo picco considerato;

V_e = volume (μL) di estratto;

V_c = volume (mL) di campione estratto;

V_i = volume (μL) di estratto iniettato.

7.8.2 Caso 2

Nelle situazioni più complesse quali:

- la presenza nel campione di più miscele (esempio Aroclor 1242+1254+1260) con i singoli congeneri alle stesse percentuali con cui sono presenti nelle soluzioni di riferimento;
- la presenza nel campione di più miscele (esempio Aroclor 1242+1254+1260) con i singoli congeneri a percentuali diverse da quelle con cui sono presenti nelle soluzioni di riferimento;
- la combinazione dei due casi precedenti;

L'accuratezza del metodo di calcolo decresce quanto più è alto il grado di alterazione rispetto alla distribuzione dei congeneri nelle soluzioni di riferimento. Se il campione presenta la stessa distribuzione dei congeneri della/delle soluzioni di riferimento, il calcolo effettuato come in 7.8.1 è infatti relativamente accurato. In caso contrario, la variabilità del dato finale è elevata, soprattutto nel caso in cui si debba utilizzare, in assenza di spettrometri di massa, il rivelatore a cattura di elettroni (ECD), che presenta fattori di risposta estremamente variabili e relativi al numero e posizione di sostituzione degli atomi di cloro nella molecola.

L'utilizzazione di un rivelatore di massa, aumentando la possibilità di identificare correttamente i singoli congeneri, aumenta di conseguenza l'attendibilità del dato quantitativo finale. Occorre comunque tenere presente che se il dato viene espresso come concentrazione nel campione di un "Aroclor x", questo significa che l'analista ritiene che il tracciato cromatografico del campione è significativamente più simile a quello dell'"Aroclor x" che a quelli degli altri Aroclor e quindi l'analisi è stata effettuata prendendo come riferimento una soluzione di riferimento di "Aroclor x".

In alternativa, se è possibile operare con una colonna capillare con adeguato programma di temperatura e se sono disponibili le soluzioni di riferimento dei singoli congeneri più abbondanti si può procedere alla identificazione e quantificazione dei congeneri stessi nel campione analizzato ed esprimere il risultato sommandone le quantità.

7.8.3 Metodo basato sulla perclorazione

Il limite più evidente della tecnica di perclorazione è l'impossibilità di avere informazioni sulle concentrazioni dei singoli congeneri e sulla miscela responsabile della contaminazione. D'altra parte, vi è il vantaggio che la determinazione non è influenzata da alcuna delle interferenze che si possono incontrare in un campione di acqua, ad eccezione della eventuale presenza del bifenile nel campione.

Si ricorda ancora che il dato quantitativo viene espresso come DCB (decaclorobifenile) originato dalla perclorazione di tutti i clorobifenili presenti nel campione ed è quindi necessario, per una sua corretta valutazione, specificare che è stata adottata la tecnica della perclorazione per l'analisi.

Nota: si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico". Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL: D 3534 (1981), "Tentative Test Method for Polychlorinated Biphenyls (PCB's) in Water".

Decreto Legislativo 152/99, Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole, *G. U. n. 124, 29 maggio 1999, Supplemento Ordinario n. 101/L.*

JAPENGA J., WAGENAAR W.J., SMEDES F. & SALOMONS W. (1987): "A new, rapid clean-up procedure for the simultaneous determination of different groups of organic micropollutants in sediments; application in two european estuarine sediment studies", *Environ. Technol. Lett.*, **8**, 9.

LEONI V., CREMISINI C., CASUCCIO A. & GULLOTTI A. (1991): "The separation of pesticides and related compounds, polychlorobiphenyls and other pollutants into four groups by silica gel microcolumn chromatography (Application to surface water analysis)", *Pestic. Sci.*, **31**, 209-220.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1982): "Method 617, The Determination of Organohalide Pesticides and PCBs in Municipal and Industrial Wastewater".

5120. Richiesta biochimica di ossigeno (BOD₅)

Il saggio del BOD (Biochemical Oxygen Demand) esprime la quantità di ossigeno necessaria per l'ossidazione biochimica delle sostanze contenute in un'acqua nelle condizioni in cui viene eseguito il saggio stesso. Detta determinazione tende a riprodurre, in laboratorio, le condizioni che si possono verificare normalmente nei corpi idrici e negli impianti di depurazione di tipo biologico.

La richiesta di ossigeno è dovuta generalmente a tre classi di sostanze: composti organici, i cui atomi di carbonio vengono utilizzati dai microrganismi come alimento per le varie attività vitali (accrescimento, respirazione, riproduzione); composti ossidabili dell'azoto, utilizzati come fonte energetica da batteri specifici come ad esempio il Nitrosomonas e il Nitrobacter; sostanze inorganiche, come ad esempio ferro (II), solfuri e solfiti, che vengono facilmente ossidate dall'ossigeno presente nelle acque.

Le sostanze appartenenti alle prime due classi consumano ossigeno attraverso meccanismi biochimici, mentre quelle appartenenti alla terza classe generalmente attraverso processi chimici. La determinazione può essere effettuata con metodi chimici, fisici ed elettrochimici.

I metodi chimici, di cui si riferisce nel seguito, possono essere eseguiti in qualunque laboratorio, senza l'impiego di particolari apparecchiature.

Le condizioni operative per la determinazione del BOD₅ con metodi chimici devono essere stabilite di volta in volta, in relazione alla natura e alla concentrazione delle sostanze ossidabili, nonché alla presenza di un idoneo consorzio batterico.

Ciò premesso, a seconda del tipo di campione da analizzare, si adatterà uno dei seguenti metodi.

METODO A - Determinazione diretta

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla determinazione dell'ossigeno disciolto nel campione da analizzare prima e dopo incubazione di cinque giorni, al buio ed alla temperatura di 20°C.

La differenza fra le due determinazioni dà il valore del BOD₅ del campione, espresso in mg/L di ossigeno.

2. Campo di applicazione

Il metodo può essere applicato ad acque naturali e di scarico poco inquinate, aventi un BOD₅ inferiore a 5 mg/L, purchè non siano presenti sostanze inibitrici, i valori di pH siano compresi tra 6,5 ed 8,3 e sia garantito un adeguato consorzio batterico.

3. Interferenze e cause di errore

Interferiscono positivamente tutte quelle sostanze che vengono ossidate chimicamente dall'ossigeno disciolto; l'interferenza può comunque essere valutata in termini numerici a condizioni che la reazione di ossidazione venga supposta completa.

Ad esempio, nel caso di nitriti, ferro (II), solfuri e solfiti, che vengono rispettivamente ossidati a nitrati, ferro (III), zolfo e solfati, l'interferenza risulta pari a:

- 1 mg di nitriti (come azoto) = 1,14 mg di ossigeno;
- 1 mg di ossido di ferro (II) = 0,12 mg di ossigeno;
- 1 mg di idrogeno solforato = 0,47 mg di ossigeno;
- 1 mg di acido solforoso = 0,20 mg di ossigeno.

Interferenze negative possono essere provocate dalla presenza di cloro libero o metalli tossici a causa della loro azione inibitrice. Analoga azione inibitrice è causata da valori di pH inferiori a 6,5 o superiori a 8,3.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

Si raccomanda di effettuare la determinazione del BOD₅ entro il minor tempo possibile dal prelievo del campione, onde evitare di ottenere valori in difetto conseguenti all'attività batterica. Ove ciò non sia possibile, occorre conservare il campione a 3-4°C per un periodo non superiore a 24 ore.

5. Apparecchiature

Attrezzatura di uso comune in laboratorio, e:

5.1 *Bottiglie di incubazione*, della capacità di 300 mL ($\pm 1,5$ mL), fornite di tappo a smeriglio a tenuta, numerate sul corpo e sul tappo e dotate di idonea svasatura per garantire la tenuta idraulica. Il volume di ciascuna bottiglia nel caso in cui non si disponga di bottiglie tarate deve essere determinato a 20°C e annotato.

5.2 *Termostato*, da usare a 20°C, regolabile a $\pm 1^\circ\text{C}$.

5.3 *Compressore o bombola di aria compressa*

Purificare l'aria per passaggio attraverso una bottiglia di lavaggio contenente acqua o ricorrendo ad altri dispositivi atti ad eliminare eventuali impurezze.

5.4 *Setto poroso per l'aerazione*

6. Reattivi

Utilizzare soltanto acqua distillata o deionizzata e reattivi di grado analitico.

6.1 *Soluzione alcalina di ioduro di potassio e sodio azide*

Sciogliere rapidamente 500 g di idrossido di sodio (NaOH), posti in una beuta da 1000 mL munita di tappo di gomma, in 250 mL di acqua e raffreddare a temperatura ambiente, aggiungere 150 g di ioduro di potassio (KI) e diluire a circa 800 mL.

Aggiungere lentamente alla soluzione fredda, sotto continua agitazione, 10 g di sodio azide (NaN₃) previamente disciolti in 40 mL di acqua. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua. Conservare in bottiglia scura munita di tappo di gomma.

6.2 Soluzione di solfato di manganese (364 g/L)

Sciogliere 364 g di solfato di manganese (II) monoidrato ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) in acqua; filtrare, se necessario, e diluire a 1000 mL.

6.3 Soluzione di fluoruro di potassio (400 g/L)

Sciogliere 40 g di fluoruro di potassio diidrato ($\text{KF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in acqua e diluire a 100 mL.

6.4 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,1 N)

Si consiglia l'utilizzo di soluzioni 0,1 N disponibili in commercio.

In alternativa, sciogliere, in un matraccio tarato da 1 L, 25 g di tiosolfato sodico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in circa 800 mL di acqua deionizzata. Aggiungere come stabilizzante 1 g di carbonato sodico (Na_2CO_3) oppure 4 g di tetraborato sodico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Portare a 1 L con acqua. Il controllo del titolo della soluzione di tiosolfato viene eseguito con soluzioni 0,1 N di KIO_3 o $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$ disponibili in commercio o preparate sciogliendo 3,5670 g di KIO_3 o 3,2500 g di $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$ in acqua e diluendo ad 1 L.

In una beuta con tappo a smeriglio sciogliere 2 g di KI esente da iodio in circa 100 mL di acqua. Aggiungere 7 mL di HCl concentrato e trasferire nella beuta 25-30 mL di soluzione di iodato o di idrogeniodato di potassio precedentemente preparata. Titolare immediatamente con la soluzione di tiosolfato usando salda d'amido come indicatore, secondo le modalità indicate nel seguente Capitolo 7. Noti il volume e la normalità della soluzione di riferimento e il volume di tiosolfato consumato nella titolazione ricavare la normalità della soluzione di tiosolfato.

6.5 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,0125 N)

Diluire 125 mL della soluzione (6.4) a 1000 mL con acqua. 1 mL di soluzione 0,0125 N corrisponde a 0,1 mg di ossigeno. La soluzione deve essere preparata al momento dell'uso.

6.6 Salda d'amido

Porre in un mortaio 5-6 g di amido e alcuni millilitri di acqua fredda. Macinare la pasta risultante, che viene poi versata in 1000 mL di acqua bollente. Far bollire per pochi minuti e lasciar depositare una notte. Utilizzare il liquido sovrastante. La soluzione può essere stabilizzata aggiungendo, per ogni litro, circa 1 g di acido salicilico o qualche goccia di toluene.

6.7 Acido solforico concentrato ($d=1,84$)

7. Procedimento

Aerare il campione in esame a saturazione per circa 10 minuti e lasciarlo riposare per 10 minuti, mantenendo la temperatura del campione a circa 20°C. In questo modo si può evitare la sovrasaturazione del campione. Trasferire il campione per sifonamento, evitando la formazione di bolle, in almeno due bottiglie da 300 mL (5.1). Riempire le bottiglie sino a circa 1 cm oltre l'inizio del cono a smeriglio.

Utilizzare almeno una delle bottiglie per il dosaggio del contenuto di ossigeno al tempo 0 secondo le modalità descritte al Paragrafo (7.1); porre l'altra (o le altre) in termostato a 20°C per 5 giorni, in completa oscurità per prevenire la produzione di ossigeno da parte delle alghe.

Al termine del periodo d'incubazione determinare l'ossigeno disciolto residuo secondo le modalità indicate al Paragrafo (7.1).

7.1 Determinazione dell'ossigeno disciolto

Aggiungere al campione contenuto nella bottiglia con tappo a smeriglio, 2 mL di soluzione di solfato di manganese (6.2) e 2 mL di soluzione alcalina di ioduro-sodio azide (6.1), avendo cura di introdurre le soluzioni sotto la superficie del liquido.

Chiudere la bottiglia eliminando le bolle d'aria e agitare capovolgendo molte volte la bottiglia; ripetete l'agitazione una seconda volta dopo che il precipitato si è depositato lasciando il liquido sovrastante limpido.

Quando il precipitato si è nuovamente depositato lasciando almeno 100 mL di liquido limpido, aprire la bottiglia e aggiungere 2 mL di H₂SO₄ concentrato (6.7), avendo cura di farlo fluire lungo il collo della bottiglia.

Se il campione contiene ferro (III), aggiungere, prima di acidificare, 1 mL di soluzione di fluoruro di potassio (6.3). Tappare nuovamente la bottiglia ed effettuare il mescolamento capovolgendo varie volte la bottiglia finchè lo iodio non è uniformemente distribuito. Far decantare la soluzione e titolare subito 100 mL con la soluzione di tiosolfato (6.5), fino a un colore giallo paglierino. Aggiungere la salda d'amido e continuare a titolare fino a scomparsa del colore azzurro.

8 Calcoli

La concentrazione di ossigeno disciolto è dato da:

$$C = \frac{a \cdot N \cdot f \cdot 8 \cdot 1000}{V}$$

dove:

C = concentrazione (mg/L) di ossigeno disciolto;

a = volume (mL) di soluzione di tiosolfato di sodio utilizzato nella titolazione;

N = normalità della soluzione di tiosolfato di sodio;

8 = peso equivalente dell'ossigeno;

V = volume (mL) di campione utilizzato per la titolazione;

f = fattore di correzione per il volume dei reagenti introdotti nella bottiglia d'incubazione.

Il fattore di correzione (f) è dato da:

$$f = \frac{B}{B-b}$$

dove:

B = volume (mL) della bottiglia adoperata

b = volume totale (mL) dei reattivi impiegati per la precipitazione.

Se X e Y sono le concentrazioni di ossigeno disciolto nel campione, rispettivamente prima e dopo l'incubazione del campione stesso, il valore di BOD₅ (espresso come mg O₂/L) si ricava dalla seguente espressione:

$$BOD_5 = (X - Y)$$

9. Qualità del dato

Per valutare la precisione del metodo è necessario impiegare una soluzione di riferimento di glucosio e acido glutammico (*), preparata secondo le modalità indicate alla nota del Capitolo 9 del Metodo B1.

(*) Il consumo è opportuno che corrisponda al 40-70% dell'ossigeno disciolto presente prima dell'incubazione.

Lo scarto tipo (riproducibilità), ottenuta valutando i risultati di misura di 3 laboratori su 3 campioni ciascuno, per una concentrazione di circa 200 mg/L è di ± 30 mg/L. Ripetizioni delle misure nello stesso laboratorio indicano uno scarto tipo pari a ± 10 mg/L.

METODI B - Determinazione mediante diluizione

METODO B1 - Determinazione mediante diluizione, senza inoculo

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla determinazione dell'ossigeno disciolto nel campione da analizzare, opportunamente diluito, prima e dopo una incubazione, al buio e alla temperatura di 20°C, di 5 giorni. La differenza tra le due determinazioni, moltiplicata per il fattore di diluizione, dà il valore del BOD₅ del campione in esame, espresso in mg/L di ossigeno.

2. Campo di applicazione

Il metodo trova applicazione nella misura del BOD₅ in acque naturali o di scarico, purchè non siano presenti sostanze inibitrici, i valori di pH siano compresi tra 6,3 e 8,5 e sia garantita la presenza di un idoneo consorzio batterico. Mentre per misurare valori di BOD₅ inferiori a 5 mg/L il campione viene analizzato tal quale (Metodo A), nel caso, invece, di valori del BOD₅ superiori a 5 mg/L è necessario ricorrere ad una adeguata diluizione. La diluizione deve essere stabilita in relazione al BOD₅ presunto del campione. Così ad esempio, se il valore presunto è compreso tra 5 mg/L e 12 mg/L, è opportuno diluire un volume del campione con un ugual volume di acqua di diluizione (6.8); se esso è compreso fra 12 mg/L e 25 mg/L, un volume del campione è diluito con quattro volumi dell'acqua di diluizione (6.8). Per valori superiori di BOD₅ è necessario effettuare diluizioni tali da ottenere un campione che, dopo il periodo di incubazione, presenti una quantità residua di ossigeno in grado di essere rilevata analiticamente (*). La diluizione deve essere eseguita con acqua di diluizione (6.8) preparata di fresco e satura d'ossigeno a 20°C.

3. Interferenze e cause d'errore

Interferiscono positivamente tutte quelle sostanze che vengono ossidate chimicamente dall'ossigeno disciolto. L'interferenza può comunque essere valutata in termini numerici a condizione che la reazione di ossidazione venga supposta completa.

Ad esempio nel caso di nitriti, ferro (II), solfuri e solfiti, che vengono rispettivamente ossidati a nitrati, ferro (III), zolfo e solfati, l'interferenza risulta pari a:

- 1 mg di nitriti (come azoto) = 1,14 mg di ossigeno;
- 1 mg di ossido di ferro (II) = 0,12 mg di ossigeno;
- 1 mg di idrogeno solforato = 0,47 mg di ossigeno;
- 1 mg di acido solforoso = 0,20 mg di ossigeno.

Interferiscono negativamente tutte le sostanze che, se presenti a una data concentrazione, esercitano un'azione inibente sull'attività dei microrganismi, rallentando o bloccando i processi ossidativi. In questi casi può accadere che tali errori siano evitati quando nei campioni in esame, con la diluizione necessaria per la esecuzione della misura del BOD₅, la con-

(*) Il consumo è opportuno che corrisponda al 40-70% dell'ossigeno disciolto presente prima dell'incubazione.

centrazione delle sostanze inibenti risulti riportata al di sotto della soglia d'interferenza. Le interferenze negative possono essere superate mediante trattamento del campione. Ad esempio il pH del campione può essere corretto mediante aggiunta di acido solforico o idrossido di sodio (entrambi circa 1 M), mentre per quanto concerne il cloro presente in campioni provenienti da trattamenti di clorazione è necessario un trattamento con solfito di sodio.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

Si raccomanda di effettuare la determinazione del BOD₅ entro il minor tempo possibile dal prelievo del campione, onde evitare di ottenere valori in difetto conseguenti all'attività batterica. Ove ciò non sia possibile, occorre conservare il campione a 3-4°C per un periodo non superiore a 24 ore.

5. Apparecchiature

Attrezzatura di uso comune in laboratorio, e:

5.1 *Bottiglie di incubazione*, della capacità di 300 mL ($\pm 1,5$ mL), fornite di tappo a smeriglio a tenuta, numerate sul corpo e sul tappo e dotate di idonea svasatura per garantire la tenuta idraulica. Il volume di ciascuna bottiglia nel caso in cui non si disponga di bottiglie tarate deve essere determinato a 20°C e annotato.

5.2 *Termostato*, da usare a 20°C, regolabile a $\pm 1^\circ\text{C}$.

5.3 *Compressore o bombola di aria compressa*

Purificare l'aria per passaggio attraverso una bottiglia di lavaggio contenente acqua o ricorrendo ad altri dispositivi atti ad eliminare eventuali impurezze.

5.4 *Setto poroso per l'aerazione*

6. Reattivi

Utilizzare soltanto acqua distillata o deionizzata e reagenti di grado analitico.

6.1 *Soluzione alcalina di ioduro di potassio e sodio azide*

Sciogliere rapidamente 500 g di idrossido di sodio (NaOH) posti in una beuta da 1000 mL munita di tappo di gomma in 250 mL di acqua, raffreddare a temperatura ambiente, aggiungere 150 g di ioduro di potassio (KI) e diluire a circa 800 mL. Aggiungere lentamente alla soluzione fredda, sotto continua agitazione, 10 g di sodio azide (NaN₃), previamente disciolti in 40 mL di acqua. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

Conservare in bottiglia scura munita di tappo di gomma.

6.2 *Soluzione di solfato di manganese (364 g/L)*

Sciogliere 364 g di solfato di manganese (II) monoidrato (MnSO₄·H₂O) in acqua; filtrare, se necessario, e diluire a 1000 mL.

6.3 Soluzione di fluoruro di potassio (400 g/L)

Sciogliere 40 g di fluoruro di potassio diidrato ($\text{KF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in acqua e diluire a 100 mL.

6.4 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,1 N)

Si consiglia l'utilizzo di soluzioni 0,1 N disponibili in commercio.

In alternativa, sciogliere, in un matraccio tarato da 1 L, 25 g di tiosolfato sodico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in circa 800 mL di acqua deionizzata. Aggiungere come stabilizzante 1 g di carbonato sodico (Na_2CO_3) oppure 4 g di tetraborato sodico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Portare a 1 L con acqua. Il controllo del titolo della soluzione di tiosolfato viene eseguito con soluzioni 0,1 N di KIO_3 o $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$ disponibili in commercio o preparate sciogliendo 3,5670 g di KIO_3 o 3,2500 g di $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$ in acqua e diluendo ad 1 L.

In una beuta con tappo a smeriglio sciogliere 2 g di KI esente da iodio in circa 100 mL di acqua. Aggiungere 7 mL di HCl concentrato e trasferire nella beuta 25-30 mL di soluzione di iodato o di idrogeniodato di potassio precedentemente preparato. Titolare immediatamente con la soluzione di tiosolfato usando salda d'amido come indicatore, secondo le modalità indicate al Capitolo 7. Noti il volume e la normalità della soluzione di riferimento e il volume di tiosolfato consumato nella titolazione ricavare la normalità della soluzione di tiosolfato.

6.5 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,0125 N)

Diluire 125 mL della soluzione (6.4) a 1000 mL con acqua. 1 mL di soluzione 0,0125 N corrisponde a 0,1 mg di ossigeno. La soluzione deve essere preparata al momento dell'uso.

6.6 Salda d'amido

Porre in un mortaio 5-6 g di amido e alcuni mL di acqua fredda. Macinare la pasta risultante, che viene poi versata in 1000 mL di acqua bollente. Far bollire per pochi minuti e lasciar depositare una notte. Utilizzare il liquido sovrastante. La soluzione può essere stabilizzata aggiungendo, per ogni litro, circa 1 g di acido salicilico o qualche goccia di toluene.

6.7 Acido solforico concentrato ($d=1,84$)

6.8 Acqua di diluizione

La preparazione viene effettuata aggiungendo 1 mL di ciascuna delle seguenti soluzioni (*) a un litro d'acqua:

- soluzione di $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 0,25 g/L
- soluzione di CaCl_2 anidro a 27,5 g/L
- soluzione di $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 22,5 g/L
- soluzione tampone a pH 7,2.

La soluzione tampone a pH 7,2 viene preparata sciogliendo 21,75 g di K_2HPO_4 ; 8,5 g di KH_2PO_4 ; 33,4 g di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,7 g di NH_4Cl , in un litro d'acqua.

Aerare la soluzione a saturazione per 15 minuti e lasciare a riposo per almeno altri 15 minuti. L'acqua di diluizione è stabile al massimo per una settimana. Trascorso detto tempo deve essere ripreparata avendo cura di lavare bene i contenitori con miscela cromica, risciacquando con acqua.

(*) Nella determinazione del BOD_5 , se si vuole escludere il contributo dei processi di nitrificazione, che generalmente si instaurano dopo che è stata soddisfatta la richiesta da parte delle sostanze carboniose, occorre aggiungere un agente chimico inibente. Per esempio, 1 mL di una soluzione contenente 0,5 g/L di allitiourea in acqua oltre alle soluzioni indicate.

7. Procedimento

Qualora il campione in esame presenti delle sostanze che interferiscono nella misura del BOD₅, bisogna sottoporlo ad opportuni trattamenti, secondo quanto descritto al Capitolo 3. Stabilire la diluizione o le diluizioni più opportune, introdurre cautamente acqua di diluizione (6.8), aerata a saturazione, per sifonamento o per caduta da una bottiglia di Mariotte, assicurandosi che non si abbiano forti rimescolamenti e conseguenti variazioni del contenuto d'ossigeno.

Riempire le bottiglie sino a circa 1 cm al di sopra della linea che segna l'inizio del cono a smeriglio. Utilizzare almeno una delle bottiglie per il dosaggio del contenuto di ossigeno al tempo 0 secondo le modalità descritte al Paragrafo (7.1) del Metodo A; porre l'altra (o le altre) in termostato a 20°C per 5 giorni, in completa oscurità per prevenire la produzione di ossigeno da parte delle alghe.

Contemporaneamente travasare un campione d'acqua di diluizione (6.8), aerata a saturazione, con le stesse modalità in almeno due bottiglie: utilizzarne una per la determinazione del contenuto al tempo zero dell'ossigeno disciolto e l'altra per l'incubazione. Al termine del periodo d'incubazione determinare, sia nel campione in esame sia nell'acqua di diluizione, l'ossigeno disciolto residuo, secondo il procedimento descritto al Metodo A (7.1).

8. Calcoli

Calcolare il BOD₅ tramite la formula seguente:

$$C_{\text{BOD}_5} = (X - Y) \frac{V}{v} - (C - E) \frac{V - v}{v}$$

dove:

C_{BOD_5} = Domanda biochimica di ossigeno (mg O₂/L);

X = ossigeno disciolto (mg/L) nel campione diluito prima della incubazione;

Y = ossigeno disciolto (mg/L) nel campione diluito dopo l'incubazione;

V = volume (mL) della bottiglia di incubazione;

v = volume (mL) del campione preso in esame;

C = ossigeno disciolto (mg/L) nell'acqua di diluizione prima dell'incubazione;

E = ossigeno disciolto (mg/L) nell'acqua di diluizione dopo l'incubazione.

9. Qualità del dato

Per valutare la precisione del metodo è necessario impiegare una soluzione di riferimento di glucosio e acido glutammico(*).

Lo scarto tipo (riproducibilità) ottenuta valutando i risultati di misura di 3 laboratori su 3 campioni ciascuna, per una concentrazione di circa 200 mg/L è di ±30 mg/L. Ripetizioni delle misure nello stesso laboratorio indicano uno scarto tipo pari a ±10 mg/L.

(*) Generalmente questa soluzione di riferimento si prepara sciogliendo in acqua distillata 150 mg di glucosio e 150 mg di acido glutammico, previamente essiccati entrambi per un'ora a 105°C, e portando a 1000 mL con acqua distillata.

Prelevare aliquote di 5,0 mL di questa soluzione, portare a volume la bottiglia da BOD con acqua di diluizione inoculata e procedere alla determinazione del BOD della soluzione di riferimento.

Questa soluzione corrisponde ad un valore di BOD₅ pari a 218±11 mg/L.

METODO B2 - Determinazione mediante diluizione, con inoculo

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla determinazione dell'ossigeno disciolto nel campione da analizzare, opportunamente diluito e inoculato, prima e dopo una incubazione di 5 giorni al buio e alla temperatura di 20°C.

La differenza tra le due determinazioni, moltiplicata per il fattore di diluizione, dà il valore del BOD₅ del campione in esame espresso in mg/L di ossigeno.

2. Campo di applicazione

Questo metodo per la determinazione del BOD₅ può essere applicato in acque sterili o che contengono sostanze inibenti l'attività batterica, o che richiedano particolari inoculi.

3. Interferenze e cause d'errore

Interferiscono positivamente tutte quelle sostanze che vengono ossidate chimicamente dall'ossigeno disciolto. L'interferenza può comunque essere valutata in termini numerici a condizione che la reazione di ossidazione venga supposta completa.

Ad esempio nel caso di nitriti, ferro (II), solfuri e solfiti, che vengono rispettivamente ossidati a nitrati, ferro (III), zolfo e solfati, l'interferenza risulta pari a:

- 1 mg di nitriti (come azoto) = 1,14 mg di ossigeno;
- 1 mg di ossido di ferro (II) = 0,12 mg di ossigeno;
- 1 mg di idrogeno solforato = 0,47 mg di ossigeno;
- 1 mg di acido solforoso = 0,20 mg di ossigeno.

Interferiscono negativamente tutte le sostanze che, se presenti a una data concentrazione, esercitano un'azione inibente sull'attività dei microrganismi, rallentando o bloccando i processi ossidativi. In questi casi può accadere che tali errori siano evitati quando nei campioni in esame, con la diluizione necessaria per la esecuzione della misura del BOD₅, la concentrazione delle sostanze inibenti risulti riportata al di sotto della soglia d'interferenza.

Le interferenze negative possono essere superate mediante trattamento del campione. Ad esempio il pH del campione può essere corretto mediante aggiunta di acido solforico o idrossido di sodio (entrambi circa 1 M), mentre per quanto concerne il cloro presente in campioni provenienti da trattamenti di clorazione è necessario un trattamento con solfito di sodio.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

Si raccomanda di effettuare la determinazione del BOD₅ entro il minor tempo possibile dal prelievo del campione, onde evitare di ottenere valori in difetto conseguenti all'attività batterica. Ove ciò non sia possibile, occorre conservare il campione a 3-4°C per un periodo non superiore a 24 ore.

5. Apparecchiature

Attrezzatura di uso comune in laboratorio, e:

5.1 *Bottiglie di incubazione*, della capacità di 300 mL ($\pm 1,5$ mL), fornite di tappo a sme-

riglio a tenuta, numerate sul corpo e sul tappo e dotate di idonea svasatura per garantire la tenuta idraulica. Il volume di ciascuna bottiglia nel caso in cui non si disponga di bottiglie tarate deve essere determinato a 20°C e annotato.

5.2 *Termostato*, da usare a 20°C, regolabile a $\pm 1^\circ\text{C}$.

5.3 *Compressore o bombola di aria compressa*

Purificare l'aria per passaggio attraverso una bottiglia di lavaggio contenente acqua o ricorrendo ad altri dispositivi atti ad eliminare eventuali impurezze.

5.4 *Setto poroso per l'aerazione*

6. Reattivi

Utilizzare soltanto acqua distillata o deionizzata e reagenti di grado analitico.

6.1 *Soluzione alcalina di ioduro di potassio e sodio azide*

Sciogliere rapidamente 500 g di idrossido di sodio (NaOH) posti in una beuta da 1000 mL munita di tappo di gomma in 250 mL di acqua, raffreddare a temperatura ambiente, aggiungere 150 g di ioduro di potassio (KI) e diluire a circa 800 mL. Aggiungere lentamente alla soluzione fredda, sotto continua agitazione, 10 g di sodio azide (NaN_3), previamente disciolti in 40 mL di acqua. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

Conservare in bottiglia scura munita di tappo di gomma.

6.2 *Soluzione di solfato di manganese (364 g/L)*

Sciogliere 364 g di solfato di manganese (II) monoidrato ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) in acqua; filtrare, se necessario, e diluire a 1000 mL.

6.3 *Soluzione di fluoruro di potassio (400 g/L)*

Sciogliere 40 g di fluoruro di potassio diidrato ($\text{KF} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in acqua e diluire a 100 mL.

6.4 *Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,1 N)*

Si consiglia l'utilizzo di soluzioni 0,1 N disponibili in commercio.

In alternativa, sciogliere, in un matraccio tarato da 1 L, 25 g di tiosolfato sodico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) in circa 800 mL di acqua deionizzata. Aggiungere come stabilizzante 1 g di carbonato sodico (Na_2CO_3) oppure 4 g di tetraborato sodico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Portare a 1 L con acqua. Il controllo del titolo della soluzione di tiosolfato viene eseguito con soluzioni 0,1 N di KIO_3 o $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$ disponibili in commercio o preparate sciogliendo 3,5670 g di KIO_3 o 3,2500 g di $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$ in acqua e diluendo ad 1 L.

In una beuta con tappo a smeriglio sciogliere 2 g di KI esente da iodio in circa 100 mL di acqua. Aggiungere 7 mL di HCl concentrato e trasferire nella beuta 25-30 mL di soluzione di iodato o di idrogeniodato di potassio precedentemente preparato. Titolare immediatamente con la soluzione di tiosolfato usando salda d'amido come indicatore, secondo le modalità indicate al Capitolo 7. Noti il volume e la normalità della soluzione di riferimento e il volume di tiosolfato consumato nella titolazione ricavare la normalità della soluzione di tiosolfato.

6.5 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,0125 N)

Diluire 125 mL della soluzione (6.4) a 1000 mL con acqua. 1 mL di soluzione 0,0125 N corrisponde a 0,1 mg di ossigeno. La soluzione deve essere preparata al momento dell'uso.

6.6 Salda d'amido

Porre in un mortaio 5-6 g di amido e alcuni mL di acqua fredda. Macinare la pasta risultante, che viene poi versata in 1000 mL di acqua bollente. Far bollire per pochi minuti e lasciar depositare una notte. Utilizzare il liquido sovrastante. La soluzione può essere stabilizzata aggiungendo, per ogni litro, circa 1 g di acido salicilico o qualche goccia di toluene.

6.7 Acido solforico concentrato ($d=1,84$)

6.8 Acqua di diluizione

La preparazione viene effettuata aggiungendo 1 mL di ciascuna delle seguenti soluzioni (*) a un litro d'acqua:

- soluzione di $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 0,25 g/L;
- soluzione di CaCl_2 anidro a 27,5 g/L;
- soluzione di $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 22,5 g/L;
- soluzione tampone a pH 7,2.

La soluzione tampone a pH 7,2 viene preparata sciogliendo 21,75 g di K_2HPO_4 ; 8,5 g di KH_2PO_4 ; 33,4 g di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,7 g di NH_4Cl , in un litro d'acqua.

Aerare la soluzione a saturazione per 15 minuti e lasciare a riposo per almeno altri 15 minuti. L'acqua di diluizione è stabile al massimo per una settimana. Trascorso detto tempo deve essere ripreparata avendo cura di lavare bene i contenitori con miscela cromica, risciacquando con acqua.

7. Procedimento

7.1 Scelta e preparazione dell'inoculo

La scelta di un appropriato inoculo è un fattore molto importante nella determinazione del BOD_5 . In molti casi un inoculo soddisfacente è rappresentato dal liquido supernatante proveniente dal liquame di fogna, sedimentato e conservato in incubazione e agitato per 24 ore alla temperatura di 20°C.

Molti scarichi industriali contengono però sostanze organiche non degradabili dai consorzi microbici derivati dal liquame di fogna. In questi casi, utilizzare come inoculo l'effluente dell'impianto di depurazione asservito o il supernatante di un fango attivo prelevato presso altro impianto. Qualora i suddetti inoculi non siano disponibili, utilizzare un inoculo sviluppato in laboratorio oppure l'acqua del corpo idrico ricevente raccolta preferibilmente a 500-2000 metri a valle dal punto d'immissione degli scarichi da esaminare.

L'acqua, impiegata come inoculo, potrà fornire i migliori risultati se verrà prelevata in punti in cui si siano sviluppati particolari microrganismi capaci di utilizzare come alimento i composti organici presenti (consorzi microbici adesi a superfici sommerse). Talvolta può essere necessario concentrare l'inoculo mediante centrifugazione a 7000 giri/min per 30 minuti oppure per filtrazione (0,45 μm).

(*) Nella determinazione del BOD_5 , se si vuole escludere il contributo dei processi di nitrificazione, che generalmente si instaurano dopo che è stata soddisfatta la richiesta da parte delle sostanze carboniose, occorre aggiungere un agente chimico inibente. Per esempio, 1 mL di una soluzione di contenente 0,5 g/L di allitiourea in acqua oltre alle soluzioni indicate.

È opportuno ricordare che l'inoculo dev'essere effettuato sui campioni trattati, qualora fosse stata necessaria la correzione del pH o l'eliminazione di talune sostanze tossiche.

È possibile utilizzare come inoculo anche i microrganismi presenti nel terreno. Sospendere 100 g di terra da giardino in 1000 mL di acqua di rubinetto non clorata. Può essere utile lo stemperamento preventivo della terra in mortaio. Evitare terre troppo ricche in argilla e non prelevare campioni di terra dopo piogge prolungate. Agitare vigorosamente la sospensione, possibilmente con l'aiuto di un agitatore meccanico. Lasciar decantare per 30 minuti, raccogliere 4 litri di liquido supernatante e filtrarli su carta da filtro rapida. Eliminare i primi 200 mL e tenere i restanti in aerazione fino al momento dell'uso. L'inoculo così preparato deve essere impiegato nel giorno stesso in cui è stato preparato.

7.2 Acclimatazione

Talvolta i consorzi batterici utilizzati non sono idonei a metabolizzare alcune sostanze organiche difficilmente biodegradabili contenute in alcuni scarichi. Questo inconveniente, in taluni casi, può essere eliminato mediante un processo di acclimatazione in laboratorio.

L'acclimatazione determina la selezione e l'arricchimento del consorzio batterico, con vantaggi generici, quali, ad esempio, il superamento di inibizioni dovute a sostanze tossiche o alla composizione del campione stesso.

L'acclimatazione può essere realizzata aerando e alimentando gli arricchimenti microbici con piccole dosi giornaliere di scarichi in esame fino a quando non si sia sviluppato un consorzio microbico adatto a metabolizzare le sostanze organiche presenti.

Le modalità usualmente impiegate per la realizzazione di un processo di acclimatazione, ad esempio, di un liquame di fogna sono le seguenti:

- prelevare un campione di 4 o 5 litri, lasciar sedimentare e sottoporre a un processo di moderata aerazione per circa 24 ore;
- sospendere l'aerazione e lasciar sedimentare per 30 minuti;
- sifonare parte del liquido supernatante, sostituendolo con un'aliquota delle acque di scarico in esame da acclimatare e riportare al volume iniziale con il liquame di fogna previamente sedimentato;
- ripetere l'aerazione per altre 24 ore e lasciar poi sedimentare per 30 minuti;
- sostituire la fase supernatante con un'altra aliquota d'acqua in esame;
- ripetere le operazioni di sedimentazione ed immissione del campione con le stesse modalità aumentando gradatamente l'aliquota dell'acqua da acclimatare fino a raggiungere il 100%. A questo punto impiegare il campione con inoculo per il dosaggio del BOD₅.

7.3 Dosaggio

Effettuare le indagini preliminari per la determinazione della presenza o meno di interferenze (positive o negative) allo scopo di procedere agli opportuni pretrattamenti necessari alla loro eliminazione o riduzione, secondo le modalità prescritte nel Metodo B1. Quindi, stabilito il rapporto di diluizione più opportuno, diluire il campione in esame con acqua di diluizione (6.8) contenente l'inoculo comunque ottenuto.

Aggiungere l'inoculo orientativamente in ragione di 2 mL/L di acqua di diluizione nel caso si utilizzi liquame di fogna sedimentato, e di 20 mL/L di acqua di diluizione se si impiega acqua del corpo idrico ricevente.

Quindi procedere alla determinazione del BOD₅ applicando le stesse modalità tecniche descritte al Metodo B1 tenendo presente che è necessario porre in incubazione anche l'acqua di diluizione contenente l'inoculo semplice o acclimatato al fine di determinare il BOD₅.

8. Calcoli

Calcolare BOD₅ tramite la formula seguente:

$$C_{BOD_5} = (X - Y) \frac{V}{v} - (C - E) \frac{V - v}{v}$$

dove:

C_{BOD_5} = Domanda biochimica di ossigeno (mg O₂/L);

X = ossigeno disciolto (mg/L) nel campione diluito prima della incubazione;

Y = ossigeno disciolto (mg/L) nel campione diluito dopo l'incubazione;

V = volume (mL) della bottiglia di incubazione;

v = volume (mL) del campione preso in esame;

C = ossigeno disciolto (mg/L) nell'acqua di diluizione prima dell'incubazione;

E = ossigeno disciolto (mg/L) nell'acqua di diluizione dopo l'incubazione.

9. Qualità del dato

Per valutare la precisione del metodo è necessario impiegare una soluzione di riferimento di glucosio e acido glutammico (*).

Lo scarto tipo (riproducibilità) ottenuto valutando i risultati di misura di 3 laboratori su 3 campioni ciascuna, per una concentrazione di circa 200 mg/L è di ±30 mg/L. Ripetizioni delle misure nello stesso laboratorio indicano uno scarto tipo pari a ±10 mg/L.

APPENDICE

La misura del BOD può essere utilizzata anche per studiare la biodegradabilità delle sostanze contenute in un determinato campione. A tal fine si segue l'andamento del BOD attraverso misure effettuate da 1 a 20 giorni d'incubazione (BOD₁, BOD₂, ..., BOD₂₀) e si riportano poi i valori in diagramma, ponendo sulle ascisse i tempi di incubazione e sulle ordinate i corrispondenti valori del BOD. I valori giornalieri di BOD risulteranno più elevati, per ogni successivo giorno d'incubazione, e la differenza tra i valori di BOD riscontrati, per ciascun giorno d'incubazione successiva, diminuirà proporzionalmente, almeno per i primi cinque giorni. Dopo i cinque giorni, nel caso in cui subentrino processi di nitrificazione, potrà riscontrarsi anche un aumento.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", XX Ed. (Washington, APHA).

IRSA (1986): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", Quad. Ist. Ric. Acque, **75**, 141-142.

MARCHETTI R. (1966): "Determinazione del BOD in indagini sul torrente Seveso", Nota n. 12, *Acqua Industriale*, **43**, 23-25.

(*) Generalmente questa soluzione di riferimento si prepara sciogliendo in acqua distillata 150 mg di glucosio e 150 mg di acido glutammico, previamente essiccati entrambi per un'ora a 105°C, e portando a 1000 mL con acqua distillata. Prelevare aliquote di 5,0 mL di questa soluzione, portare a volume la bottiglia da BOD con acqua di diluizione inoculata e procedere alla determinazione del BOD della soluzione di riferimento. Questa soluzione corrisponde ad un valore di BOD₅ pari a 218±11 mg/L.

5130. Richiesta chimica di ossigeno (COD)

Il COD rappresenta la misura dell'ossigeno necessario ad ossidare chimicamente le sostanze presenti in un campione, per mezzo di un ossidante forte in ambiente acido a caldo.

Il COD viene preferito al BOD, per il minor tempo richiesto dall'analisi, nel controllo di routine di liquami grezzi e depurati, soprattutto industriali, una volta che sia stato quantificato su base statistica il rapporto COD/BOD. Tale rapporto varia in funzione del tipo di sostanze scaricate: liquami da fognature prevalentemente civili hanno, ad esempio, un rapporto COD/BOD=1,9-2,5 e ciò vale anche per molti effluenti industriali provenienti da lavorazioni alimentari.

L'uso del COD per il controllo delle acque superficiali è molto più limitato, soprattutto per il fatto che, mentre il BOD simula in qualche modo i processi di degradazione che avvengono in natura, è estremamente difficile correlare il valore del COD con gli effetti deossigenanti nel recettore. L'uso del COD può essere consigliato in quei casi in cui si sospettano sversamenti tossici per i consorzi microbici e che deprimono, totalmente o in parte, il valore del BOD.

1. Principio del metodo

Viene proposto un metodo generale applicabile a campioni acquosi contenenti concentrazioni di cloruri ≤ 1000 mg/L e procedure modificate per rendere il metodo applicabile a campioni con più di 1000 mg/L di cloruri.

Il metodo prevede l'ossidazione delle sostanze organiche ed inorganiche, presenti in un campione d'acqua, mediante una soluzione di dicromato di potassio in presenza di acido solforico concentrato e di solfato di argento, come catalizzatore dell'ossidazione. L'eccesso di dicromato viene titolato con una soluzione di solfato di ammonio e ferro (II).

La concentrazione delle sostanze organiche ed inorganiche ossidabili, nelle condizioni del metodo, è proporzionale alla quantità di dicromato di potassio consumato. Lo ione cloruro è considerato un interferente, poichè la sua ossidazione può avvenire solo nelle condizioni del metodo utilizzato per il COD e non in quelle presenti nelle acque naturali.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico (urbane ed industriali) aventi una concentrazione di cloruri ≤ 1000 mg/L. Per concentrazioni di COD > 50 mg/L si consiglia l'utilizzo di una soluzione di dicromato 0,25 N. In questi casi, qualora la concentrazione di cloruri risulti > 1000 mg/L nel campione sottoposto ad analisi e ogni qualvolta il rapporto in peso COD/cloruri nel campione di analisi sia $< 0,1$, è richiesto il ricorso alle procedure modificate nel seguito descritte.

Per concentrazioni di COD < 50 mg/L si consiglia il ricorso ad una soluzione di dicromato 0,025 N.

3. Interferenze e cause di errore

Non tutte le sostanze organiche nelle condizioni del metodo vengono ossidate in maniera completa dal dicromato di potassio (ad esempio acido acetico e composti alifatici a catena lineare).

L'impiego del solfato di argento, come catalizzatore, consente di rendere più alta la resa della reazione di ossidazione. Anche in queste condizioni alcuni composti (benzene, toluene, xileni, naftalene, antracene, ecc.) vengono ossidati solo parzialmente mentre altri (piridina, ecc.) non subiscono ossidazione. Un errore in difetto nella determinazione del COD potrebbe essere causato dalla volatilizzazione di alcune sostanze organiche. Tali perdite possono essere comunque ridotte.

I cloruri interferiscono positivamente in quanto vengono ossidati dal dicromato (1 mg di Cl⁻ corrisponde a 0,226 mg di COD). Tale interferenza, a concentrazioni di cloruri inferiori a 1000 mg/L e comunque in presenza di un rapporto in peso COD/cloruro >0,1, viene praticamente eliminata aggiungendo solfato di mercurio (II) nel rapporto in peso HgSO₄/Cl⁻=10. Per concentrazioni di cloruri superiori a 1000 mg/L, qualora il rapporto in peso COD/cloruro sia minore di 0,1 è necessario fare ricorso alle procedure A (7.3.1) e B (7.3.2) nel seguito proposte, che consentono di ridurre il valore dell'interferenza residua e di valutare sperimentalmente termini correttivi appropriati da sottrarre al valore del COD.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere fatti in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

In particolare se il campione non può essere analizzato subito dopo il prelievo, esso, al fine di evitare eventuali perdite conseguenti ad ossidazione biologica delle sostanze organiche, deve essere preservato per acidificazione fino a pH=1±2 con acido solforico (6.6). In ogni caso è consigliabile effettuare l'analisi il più presto possibile.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

5.2 Apparecchiatura in vetro per l'ebollizione a ricadere

Recipiente in vetro da 500 mL con collo di vetro smerigliato, connesso ad un condensatore a bolle (altezza minima 60 cm) per evitare perdite significative di prodotti volatili.

In alternativa, è possibile l'utilizzo di altri sistemi, disponibili in commercio, con sistema a ricadere munito di campanella, in cui il condensatore a bolle è sostituito da lunghe cannule di vetro. Questa differenza comporta un errore, dovuto alla perdita di sostanze volatili, che può rientrare nell'incertezza del metodo analitico.

5.3 *Mantello riscaldante elettrico* o analogo dispositivo in grado di portare il campione all'ebollizione.

5.4 *Buretta da 25 mL* con divisioni da 0,05 mL.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere del tipo "puro per analisi".

6.1 *Acqua*

Per la preparazione delle soluzioni dei reattivi e per le diluizioni impiegare acqua distillata e/o deionizzata.

6.2 *Solfato di mercurio (II) HgSO₄*, in cristalli.

6.3 Solfato d'argento Ag_2SO_4 , in cristalli.

6.4 Soluzione concentrata di dicromato di potassio (0,25 N)

Sciogliere 12,259 g di dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$), previamente essiccato per 2 ore a $105^\circ C$, in acqua e diluire a 1000 mL in matraccio tarato.

6.5 Soluzione diluita di dicromato di potassio (0,025 N)

Diluire a 1000 mL, in matraccio tarato, 100 mL della soluzione di dicromato di potassio 0,25 N (6.4).

6.6 Acido solforico concentrato, H_2SO_4 ($d=1,84$)

6.7 Soluzione di 1,10-fenantrolina-solfato di ferro (III) (ferroina)

Sciogliere 1,485 g di 1,10-fenantrolina monoidrato, $C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$, in circa 80 mL di acqua. Aggiungere 0,695 g di solfato di ferro (II) eptaidrato, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Agitare sino a completa dissoluzione e diluire a 100 mL con acqua.

6.8 Soluzione concentrata di solfato d'ammonio e ferro (III) (0,25 N)

Sciogliere 98 g di solfato di ammonio e ferro (II) esaidrato, $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$, in 500 mL di acqua. Aggiungere 20 mL di acido solforico concentrato (6.6), raffreddare e diluire a 1000 mL.

Il controllo del titolo di questa soluzione viene effettuato con una soluzione di bicromato di potassio 0,25 N (6.4) impiegando come indicatore una soluzione di fenantrolina (6.7).

6.9 Soluzione diluita di solfato d'ammonio e ferro (III) (0,025 N)

Diluire a 1000 mL in matraccio tarato 100 mL della soluzione di solfato di ammonio e ferro (II) 0,25 N (6.8). Il controllo del titolo della soluzione viene effettuato con una soluzione di dicromato di potassio 0,025 N (6.5).

6.10 Idrogeno ftalato di potassio $C_8H_5KO_4$, in cristalli.

1 g di idrogeno ftalato di potassio corrisponde a 1,176 g di COD.

7. Procedimento

7.1 Procedimento per acque con $COD > 50$ mg/L

Porre in un recipiente di vetro da 500 mL un campione di 50 mL o, nel caso di $COD > 900$ mg/L, una aliquota diluita a 50 mL con acqua (6.1). Aggiungere una quantità di solfato di mercurio (II) (6.2) sufficiente a bloccare i cloruri presenti (vedi Capitolo 3), 5 mL di H_2SO_4 concentrato (6.6) ed alcune sferette di vetro da ebollizione. L'acido solforico deve essere aggiunto lentamente ed agitando per avere la completa dissoluzione del solfato di mercurio (II). Il recipiente deve essere inoltre raffreddato onde evitare eventuali perdite di sostanze volatili. Aggiungere quindi 50 mg di solfato di argento (6.3) e, agitando, 25 mL della soluzione 0,25 N di dicromato di potassio (6.4). Inserire il refrigerante ed iniziare la circolazione dell'acqua. Infine, lentamente ed agitando, versare 70 mL di acido solforico concentrato (6.6). Iniziare il riscaldamento e lasciare bollire per 2 ore. Interrotto il riscaldamento, lasciare raffreddare, lavare bene il refrigerante con acqua in modo da diluire il contenuto del recipiente fino ad un volume di 350-400 mL. Aggiungere 2-3 gocce di soluzione indicatrice di fenantrolina (6.7) e titolare l'eccesso di dicromato con la soluzione di solfato di ammonio e fer-

ro (III) 0,25 N (6.8) fino a viraggio del colore da blu-verde a bruno-rosso. Eseguire in parallelo una prova in bianco sostituendo i 50 mL di campione con 50 mL di acqua (6.1).

7.2 Procedimento per acque con COD compreso fra 20 e 50 mg/L

Il procedimento è lo stesso del Paragrafo (7.1), con la sola variante dell'impiego delle soluzioni 0,025 N di dicromato di potassio (6.5) e 0,025 N di solfato di ammonio e ferro (III) (6.9) invece che le corrispondenti soluzioni 0,25 N (6.4 e 6.8).

Poichè potrebbe rivelarsi difficoltoso cogliere il viraggio di colore dell'indicatore, può essere utile determinare il punto finale per via potenziometrica.

7.3 Modifiche al metodo generale per campioni con cloruri > 1000 mg/L e rapporti in peso COD/Cl⁻ < 0,1

7.3.1 Procedura A

È applicabile nel campo di concentrazione di Cl⁻ 1000-6000 mg/L. Si differenzia rispetto al metodo generale per due modifiche, alternative l'una all'altra, consigliate per ridurre il valore dell'interferenza.

A1) L'uso di una soluzione di dicromato 0,15 N al posto della soluzione 0,25 N consigliata per COD > 50 mg/L; ovviamente la soluzione 0,15 N copre un campo di applicazione di COD più ristretto (fino a 500 mg O₂/L) rispetto a quello consentito dalla soluzione 0,25 N (fino a 900 mg O₂/L).

A2) L'uso di un rapporto in peso HgSO₄/Cl⁻ di 20:1, doppio rispetto a quello indicato nel metodo generale.

Utilizzando le modifiche indicate è stata valutata l'interferenza residua in soluzioni sintetiche contenenti concentrazioni note di idrogenoftalato di potassio, considerato come sostanza organica modello. I valori residui di interferenza ottenuti su campioni con concentrazioni di COD prossime al limite di legge (160 mg/L) e concentrazioni di Cl⁻ nell'intervallo 1000-6000 mg/L si aggirano sulle 10 unità di COD. Prove effettuate su altri composti organici hanno mostrato un effetto simile a quello dell'idrogenoftalato di potassio. Sebbene sia problematico estrapolare dalle prove sperimentali termini correttivi appropriati per condizioni estremamente eterogenee in termini di concentrazione di COD e Cl⁻ poichè l'interferenza prodotta dai cloruri è una funzione del rapporto COD/Cl⁻, si ritiene che l'applicazione di un termine correttivo di 20 unità da sottrarre al valore ottenuto di COD possa rappresentare un'ampia garanzia nei riguardi dell'interferenza, qualora i valori di COD e Cl⁻ siano rispettivamente nell'intervallo 100-200 e 1000-6000 mg/L.

7.3.2 Procedura B

La procedura fa riferimento al lavoro di Baumann su scarichi ad elevata salinità e consiste nel far ricorso ad un apparato sperimentale del tipo schematizzato in Fig. 1 che consente il recupero e la determinazione del cloro gassoso sviluppatosi durante il procedimento di ossidazione alla base della misura del COD.

Tale procedura è stata verificata su campioni contenenti concentrazioni di COD e cloruri rispettivamente nei campi 100-200 e 2000-20000 mg/L. È raccomandata nel caso di concentrazioni di Cl⁻ > 6000 mg/L; se ne sconsiglia l'uso per campioni a basso contenuto organico (COD < 100 mg/L).

Il cloro gassoso, che si sviluppa, viene raccolto nel cilindro (c) contenente 200 mL di H₂O in cui sono disciolti 2,5 g di ioduro di potassio e 5 mL di acido acetico glaciale. Lo iodio prodotto a seguito dell'ossidazione dello ioduro da parte del cloro sviluppatosi viene retrotitolato con tiosolfato sodico 0,01 N utilizzando salda d'amido come indicatore, come riportato nel metodo per la determinazione del BOD₅ (metodo 5120), al quale si rimanda anche per

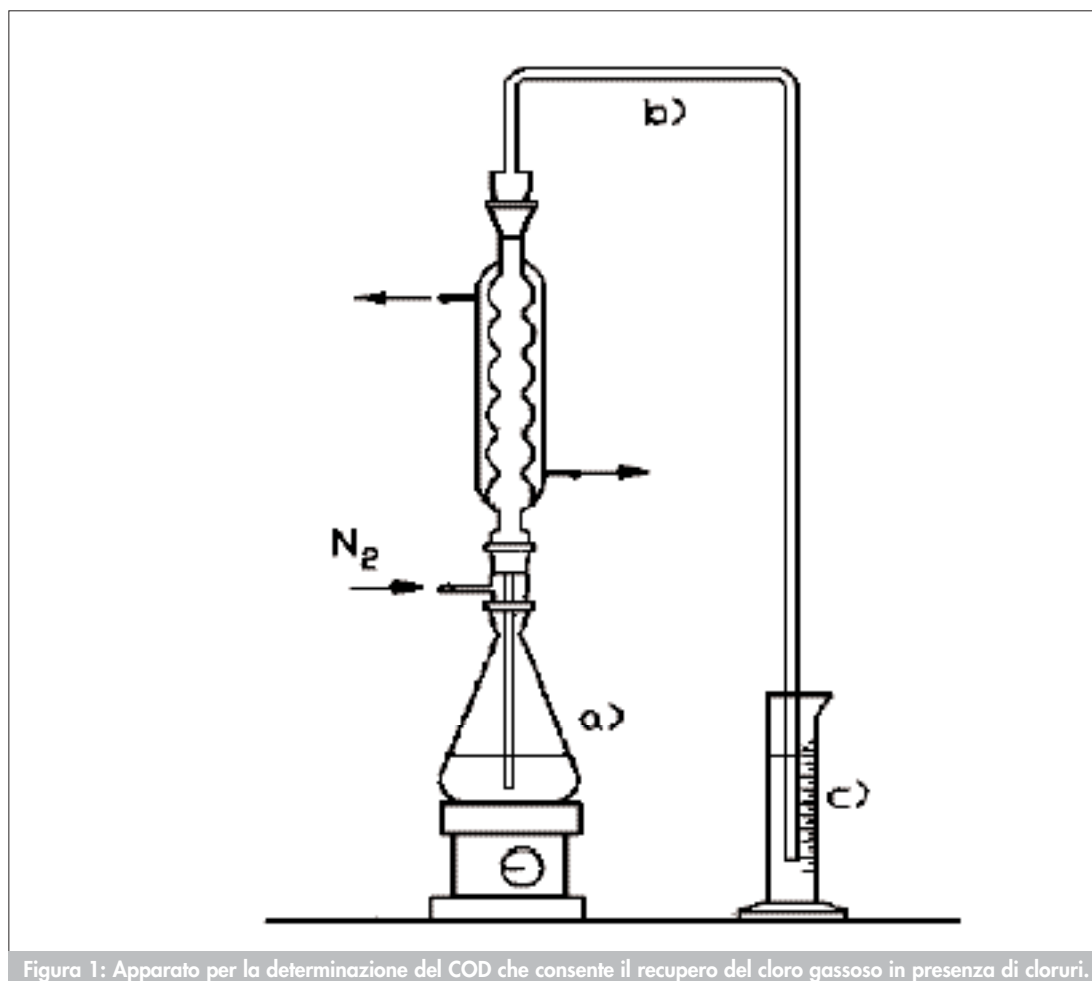


Figura 1: Apparato per la determinazione del COD che consente il recupero del cloro gassoso in presenza di cloruri.

la preparazione della soluzione di tiosolfato e dell'indicatore, tenendo presenti le modifiche da apportare per la più bassa normalità del tiosolfato.

Operare nelle condizioni previste dalla procedura A (7.3.1), che comunque consente una riduzione del termine correttivo da sottrarre, facendo gorgogliare azoto dall'inizio e per tutta la durata dell'ebollizione con un flusso di 1-2 bolle per secondo e aumentando tale flusso leggermente in fase di raffreddamento per evitare pericoli di sifonamento. Quindi disconnettere e risciacquare il tubo (b), prelevare il cilindro (c) e procedere alla titolazione con tiosolfato. Il termine correttivo da sottrarre sarà calcolato con la formula:

$$\frac{V_t \cdot N_t \cdot 8000}{V}$$

dove:

V_t = volume (mL) della soluzione di tiosolfato titolante;

N_t = normalità della soluzione di tiosolfato titolante;

8000 = peso equivalente dell'ossigeno moltiplicato per 1000, per riferire il dato al volume di un litro;

V = volume (mL) di campione sottoposto ad analisi.

Sulla beuta (a) procedere come al solito (vedi Paragrafo 7.1) alla determinazione del COD e al valore sperimentale trovato sottrarre il termine correttivo calcolato in precedenza.

Nel caso in cui il campione presenti concentrazioni di $\text{Cl}^- > 10000 \text{ mg/L}$ si consiglia il ricorso alle condizioni che prevedono l'utilizzo di dicromato 0,15 N (vedi procedura A1 del Sottoparagrafo 7.3.1). Tali condizioni, oltre ad offrire caratteristiche di qualità del dato legger-

mente superiori rispetto a quelle ottenute con dicromato 0,25 N e rapporto in peso $\text{HgSO}_4/\text{Cl} = 20$, consentono anche di ridurre significativamente sia i costi analitici che l'utilizzo di un metallo, quale il mercurio, molto pericoloso per l'ambiente.

8. Calcoli

La richiesta chimica di ossigeno (COD) viene calcolata applicando la seguente espressione (valida nel caso di assenza di diluizione del campione):

$$C = \frac{(m_1 - m_2) \cdot N \cdot 8000}{V}$$

dove:

C = richiesta chimica di ossigeno (mg/L);

m_1 = mL di soluzione di solfato di ammonio e ferro (II) consumati nella prova in bianco;

m_2 = mL di soluzione di solfato di ammonio e ferro (II) consumati per il campione;

N = normalità della soluzione di solfato di ammonio e ferro (II) impiegata;

8000 = peso equivalente dell'ossigeno moltiplicato per 1000, per riferire il dato al volume di un litro;

V = volume (mL) di campione usato per l'analisi.

Nel caso in cui si utilizzi la procedura A per campioni con Cl⁻ compreso nell'intervallo 1000-6000 mg/L e il COD sperimentale risulti compreso tra 100 e 200 mg/L sottrarre al valore sperimentale trovato un termine correttivo di 20 unità.

Invece, nel caso in cui si utilizzi la procedura B sottrarre al valore di COD sperimentale calcolato con la formula sopra specificata il valore del termine correttivo relativo al cloro gassoso sviluppato, ottenuto seguendo le modalità descritte al Sottoparagrafo (7.3.2).

9. Qualità del dato

Prove effettuate su 5 repliche di soluzioni contenenti idrogenoftalato di potassio a concentrazioni note comprese rispettivamente tra 160 e 200 mg/L e cloruri a concentrazioni comprese tra 100 e 1000 mg/L hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, inferiori all'11%.

Prove eseguite con il metodo Baumann (7.3.2) su soluzioni sintetiche di idrogenoftalato di potassio nel campo di concentrazioni 100-200 mg COD/L, in presenza di diverse concentrazioni di cloruri (2000-20000 mg/L), hanno mostrato valori del coefficiente di variazione inferiori al 15% e valori di accuratezza entro il 12%, in entrambe le condizioni sperimentali specificate al Sottoparagrafo 7.3.1 (procedure A1 e A2).

Si procede periodicamente al controllo del metodo analizzando, secondo il procedimento (7.1), una soluzione contenente 0,4251 g/L di idrogenoftalato di potassio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$), (6.10), previamente essiccato a 105°C. Parallelamente si effettua una prova in bianco sempre secondo il procedimento (7.1).

La richiesta chimica di ossigeno di questa soluzione è di 500 mg/L e la prova viene considerato soddisfacente se il recupero è almeno pari al 96% del valore teorico. Analoghi controlli possono essere eseguiti utilizzando soluzioni più diluite di idrogenoftalato di potassio.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", XX Ed., (Washington, APHA).

- ASTM (1981): "Annual Book of ASTM Standard", Part 31, Water (Philadelphia).
- BAUMANN F.J. (1974): "Dichromate reflux chemical oxygen demand. A proposed method for chloride correction in highly saline wastes", *Anal. Chem.*, **45**, (9), 1336-1338.
- BELKIN S., BRENNER A. & ABELIOVICH A. (1992): "Effect of inorganic constituents on chemical oxygen demand - I. Bromides are unneutralizable by mercuric sulfate complexation", *Wat. Res.*, **26**, (12), 1577-1581.
- BUIRNS E.R. & MARSHALL C. (1965): "Correction for chloride interference in the chemical oxygen demand test", *J. Water Pollut. Control Fed.*, **37**, 1716-1721.
- CRIPPS J.M. & JENKINS D. (1964): "A COD Method Suitable for the Analysis of Highly Saline Waters", *J. Water Pollut. Control Fed.*, **36**, 1240-1246.
- EPA (1974): "Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes". EPA-625/6-74-003a (Cincinnati, Environmental Research Center).
- IRSA (1986): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 141-142.
- PETTINE M., CAPRI S., GIACONI V., LORETI L. & NOTTOLI R. (1992): "Interferenza dei cloruri nella determinazione del COD", *Notiziario IRSA Metodi Analitici per le Acque*, **12**, (4), 35-47.
- TALINLI I. & ANDERSON G.K. (1992): "Interference of hydrogen peroxide on the standard COD test", *Wat. Res.*, **26**, (1), 107-110.

5140. Solventi organici aromatici

Introduzione

I solventi aromatici sono i composti a minor peso molecolare e maggiormente volatili appartenenti alla classe degli idrocarburi aromatici. I composti più rappresentativi sono: benzene, toluene, etilbenzene, o-, m- e p-xilene, iso ed n-propilbenzene, stirene. Tali composti risultano particolarmente tossici ed il loro uso è regolato per legge. L'inquinamento da solventi organici aromatici deriva dal loro impiego in campo industriale e dall'uso di prodotti petroliferi (in particolare benzine). La loro diffusione nell'ecosistema acquatico è legata a perdite che si possono verificare durante le fasi di trasporto e stoccaggio di prodotti derivati dal petrolio. Analogamente a quanto osservato per i solventi clorurati, la contaminazione da solventi aromatici interessa più facilmente le falde acquifere rispetto ai corpi idrici superficiali. A differenza dei primi, tuttavia, i solventi aromatici hanno una densità inferiore ed una viscosità superiore a quella dell'acqua che rendono meno favorito il loro movimento verticale verso le falde.

1. Principio del metodo

Il metodo prevede la determinazione dei solventi organici aromatici in campioni acquosi mediante gascromatografia accoppiata a: a) spazio di testa statico (HS); b) spazio di testa dinamico ("Purge & trap"). Soltanto i composti scarsamente solubili in acqua, relativamente volatili, tendono ad occupare lo spazio di testa e quindi possono essere trasferiti nel gascromatografo; in tal modo è possibile minimizzare eventuali interferenze e/o contaminazioni della colonna gascromatografica e del rivelatore.

1.1 Spazio di testa statico

L'analisi in spazio di testa statico consiste nell'analisi della fase vapore del campione, in equilibrio con la fase liquida, in una fiala ("vial") riscaldata a temperatura costante. La distribuzione dei composti organici tra le due fasi dipende dalla temperatura, dalla tensione di vapore dei singoli composti, dall'influenza della matrice del campione sui coefficienti di attività degli analiti e dal rapporto tra il volume dello spazio di testa e il volume di liquido nella fiala. Anche l'aggiunta di un sale solubile fino a saturazione può influire su detta distribuzione. Nel metodo proposto il campione acquoso, prelevato direttamente dal recipiente utilizzato per il prelievo, viene introdotto in fiale di adeguato volume che vengono chiuse ermeticamente e poste in termostato ad una temperatura e per un tempo definiti; un certo volume di fase vapore viene quindi iniettato in un gascromatografo munito di una colonna contenente una fase stazionaria di media polarità e di un rivelatore a ionizzazione di fiamma di idrogeno (FID). L'identificazione degli idrocarburi aromatici presenti è fatta in base ai tempi di ritenzione dei diversi picchi, avendo cura di mantenere costante la portata del gas di trasporto e badando all'accuratezza delle temperature del forno individuate per l'analisi. Le determinazioni quantitative si basano sul confronto fra le aree dei picchi ottenuti iniettando il campione e le aree dei picchi prodotti da soluzioni di taratura.

1.2 Spazio di testa dinamico

L'analisi in spazio di testa dinamico, proposta in alternativa, consente di raggiungere eleva-

te sensibilità. Il metodo prevede l'estrazione dalla matrice acquosa di sostanze organiche volatili, con bassa solubilità in acqua, mediante il gorgogliamento di un gas inerte in un determinato volume di campione. I composti così estratti vengono intrappolati in un apposito materiale adsorbente. Terminata l'estrazione, la trappola viene riscaldata e gli analiti sono trascinati da un flusso di gas inerte in testa alla colonna cromatografica, separati e quindi rivelati da un rivelatore FID oppure da uno più selettivo quale quello a fotoionizzazione (PID), sensibile ai legami multipli. Successivamente gli analiti vengono identificati mediante i tempi di ritenzione e quantificati in modo del tutto analogo al metodo precedente.

Con opportune scelte tecniche (vedi Appendice), il sistema analitico può essere reso idoneo alla determinazione contemporanea di "solventi organici aromatici" e "solventi clorurati".

2. Campo di applicazione

Il metodo descritto, nelle due diverse modalità, consente la determinazione di benzene, toluene, xileni, etilbenzene, iso ed n-propilbenzene, stirene in acque di scarico e superficiali. Il metodo statico è utilizzabile per concentrazioni di ciascuno dei composti sopra elencati a partire da 10 µg/L. Per taluni composti, in particolari condizioni strumentali è possibile rilevare concentrazioni anche inferiori a 0,1 µg/L. Il metodo dinamico è in grado di rivelare concentrazioni di 0,1 µg/L di ogni singolo idrocarburo aromatico. Per la sua elevata sensibilità questo metodo è applicabile anche alle acque sotterranee.

3. Interferenze e cause di errore

Composti organici diversi dagli idrocarburi aromatici sopra elencati possono avere tempi di ritenzione coincidenti con quelli dei composti in esame. I loro effetti non possono essere evitati o ridotti, come accade nel caso dei rivelatori selettivi, a causa del principio di funzionamento del rivelatore usato che è di tipo universale. Per eliminare tali effetti è necessario introdurre i campioni in due o più colonne di diversa polarità.

Le colonne capillari consentono di ottenere, generalmente, una buona sensibilità ed affidabilità nella determinazione degli analiti in oggetto. L'uso di tali colonne con annessa precolonna permette infatti una buona separazione dei picchi delle sostanze da analizzare da quelli delle sostanze interferenti. La separazione può essere migliorata aumentando la lunghezza della colonna, con conseguente allungamento dei tempi di analisi. Sarà opportuno trovare il miglior compromesso tra risoluzione, durata dell'analisi e sensibilità.

La presenza di composti altobollenti parzialmente coestratti può creare difficoltà durante l'analisi allungandone sensibilmente i tempi. Per rimuovere detti composti è necessario elevare la temperatura della colonna cromatografica fino al valore massimo consentito dalla fase stazionaria impiegata e attendere che la linea di base si stabilizzi prima di passare al raffreddamento del forno e all'introduzione del campione successivo.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento dell'acqua da analizzare deve essere effettuato in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Si consiglia l'uso di bottiglie di vetro, chiuse con un tappo a smeriglio di vetro, accuratamente pulite per evitare contaminazioni del campione e risciacquate con l'acqua da analizzare immediatamente prima dell'uso. Non filtrare l'acqua ed evitare ogni operazione che faciliti il degasaggio dei composti organici volatili disciolti.

Riempire la bottiglia fino all'orlo e tappare subito evitando di lasciare spazi gassosi nei quali possano passare i composti più volatili che andrebbero perduti all'apertura della bottiglia, fornendo risultati in difetto.

Le analisi devono essere effettuate al più presto e in ogni caso non oltre 48 ore dal prelievo, conservando il campione in frigorifero a 4°C nel periodo d'attesa.

5. Apparecchiature

5.1 *Bottiglie di vetro* per la raccolta del campione con tappo a tenuta (capacità almeno 100 mL).

5.2 *Flaconcini di vetro ("vials")* adatti per la tecnica in spazio di testa statico, di idonea capacità, con tappo con ghiera di alluminio e guarnizione in silicone teflonata, a chiusura ermetica.

5.3 *Matracci o palloni tarati* di vario volume per la preparazione e la diluizione delle soluzioni a concentrazione nota dei diversi idrocarburi aromatici e per la preparazione delle soluzioni di riferimento per la taratura.

5.4 *Pipette tarate* di vario volume a doppia tacca, classe A.

5.5 *Spatola d'acciaio* per pesate di sostanze solide.

5.6 *Microsiringhe* per liquidi da 10 μL , 50 μL , 250 μL .

5.7 *Siringa per gas* con ago sostituibile da 100-1000 μL (in assenza di autocampionatore).

5.8 *Pinze* per chiusura ed apertura delle "vials".

5.9 *Bilancia tecnica*, risoluzione 0,1 g.

5.10 *Bilancia analitica*, risoluzione 0,1 mg.

5.11 *Gasromatografo*, dotato di un forno per le colonne di sufficiente capacità e di un rivelatore a ionizzazione di fiamma di idrogeno ed eventualmente dotato di autocampionatore idoneo a lavorare alla temperatura selezionata per la termostatazione. Le temperature di iniettore, forno e rivelatore debbono essere controllabili in modo indipendente.

5.12 *Colonna cromatografica*: capillare di vetro o silice fusa con fase stazionaria di media polarità, di opportuna lunghezza e diametro interno; precolonna di pari diametro.

5.13 *Termostato* indipendente per campioni e soluzioni di riferimento, per i casi in cui il gasromatografo non sia dotato di autocampionatore termostato.

5.14 *Elaboratore di dati cromatografici* per la misura delle aree dei picchi ed eventualmente per l'impiego di un metodo di taratura esterna o interna, con possibilità di stampa di dati e cromatogrammi.

Per il metodo in spazio di testa dinamico oltre alla vetreria, microsiringhe, colonne ed accessori cromatografici già indicati si ricorre a:

5.15 *Siringhe monouso* da 5 e 10 mL.

5.16 *Campionatore "Purge and trap"* manuale o automatico.

5.17 *Trappola* costituita da idoneo materiale adsorbente.

5.18 *Gasromatografo* dotato di rivelatore FID oppure a fotoionizzazione.

La vetreria e i materiali impiegati devono essere riservati alla procedura analitica in oggetto. La vetreria di cui ai punti 5.1, 5.2, 5.3 dopo il lavaggio va trattata a 180-200°C per alme-

no 3 ore; i tappi e le guarnizioni vanno lavati in n-pentano e asciugati in stufa a 90°C. Le fiale devono essere trattate di norma a 200°C per almeno 3 ore; nel caso di presenza di composti altobollenti, le fiale andranno trattate a temperature superiori, anche 400°C, ed eventualmente con miscela cromica. All'interno delle siringhe per campionamento gas deve essere fatto passare un flusso di gas inerte dopo ogni iniezione.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua utilizzata deve essere esente da sostanze organiche.

6.1 *Elio o idrogeno puro per gascromatografia*, usato come gas di trasporto, eventualmente passato attraverso una trappola a setacci molecolari tipo 5 A.

6.2 *Idrogeno e aria puri per gascromatografia* usati come combustibile e comburente per il rivelatore a ionizzazione di fiamma di idrogeno, eventualmente purificati attraverso trappole a setacci molecolari tipo 5 A.

6.3 *Setacci molecolari tipo 5 A* attivati a 350°C per alcune ore in corrente di gas inerte.

6.4 *Cloruro di sodio (NaCl)*

6.5 *Alcol metilico (CH₃OH)*

6.6 *Idrocarburi aromatici* (benzene, toluene, etilbenzene, o-, m-, p-xilene, isopropilbenzene, n-propilbenzene, stirene) di elevata purezza per la preparazione delle soluzioni di riferimento.

Verificare che ogni composto dia un solo picco cromatografico nelle condizioni di lavoro previste per le soluzioni di riferimento. In considerazione della composizione molto variabile dei campioni d'acqua da analizzare, è opportuno disporre anche di soluzioni di riferimento di singoli composti oltre che delle miscele.

6.7 *Trifluorobenzene*, oppure *1-Cloro-2-Fluorobenzene*, oppure altra sostanza idonea ad essere usata quale riferimento interno per determinazioni sia di idrocarburi aromatici che di composti organoalogenati.

7. Procedimento

7.1 *Spazio di testa statico*

7.1.1 Preparazione delle soluzioni concentrate (1 mg/mL di ciascun idrocarburo aromatico)

Per determinare le concentrazioni dei diversi idrocarburi aromatici presenti nel campione in esame è consigliabile preparare soluzioni a concentrazione nota dei diversi composti in acqua e applicare a queste la stessa tecnica di preparazione usata per campioni incogniti (7.1.4). Pesare 100 mg di ciascun composto da dosare trasferendo con una microsiringa un'aliquota della soluzione di riferimento commerciale in palloni tarati da 100 mL. Il volume dell'aliquota da prelevare si può calcolare dal valore della densità del riferimento utilizzato. L'accuratezza dei volumi prelevati viene verificata attraverso la pesata del singolo analita. Portare a volume con metanolo (6.5) mescolando con cura. Queste soluzioni, conservate in frigorifero, sono stabili un mese.

7.1.2 Preparazione della soluzione mista (0,01 mg/mL di ciascun idrocarburo aromatico)

In un pallone tarato da 100 mL introdurre circa 80 mL di metanolo e aggiungere con una pipetta 1 mL di ciascuna delle soluzioni 7.1.1. Portare a volume con metanolo mescolando con cura.

7.1.3 Preparazione della soluzione diluita (0,1 mg/L di ciascun idrocarburo aromatico)

In un pallone tarato da 100 mL introdurre circa 90 mL di acqua esente da sostanze organiche e aggiungere con una pipetta 1 mL della soluzione 7.1.2. Portare a volume mescolando con cura. Questa soluzione acquosa deve essere preparata quotidianamente. A partire da questa soluzione (o eventualmente da una di maggior concentrazione) preparare almeno tre diverse soluzioni di taratura e ricavare le rette di taratura per i singoli composti.

7.1.4 Preparazione del campione

Introdurre un idoneo volume di campione (generalmente da 5 a 15 mL) in una "vial" da 10 mL o 20 mL, in modo che il volume di liquido sia circa 3/4 del totale, prelevandola direttamente dal recipiente utilizzato per il prelievo; saturare con cloruro di sodio, chiudere la "vial" ermeticamente e agitare vigorosamente per favorire la dissoluzione del sale; termostatare alla temperatura e per il tempo predeterminati.

7.1.5 Analisi

Analizzare almeno tre soluzioni di riferimento, seguendo la procedura indicata in (7.1.4) per la preparazione del campione e applicando le condizioni riportate in Tab. 1. Tali condizioni hanno carattere esemplificativo e potranno essere ottimizzate dagli operatori in funzione della strumentazione disponibile e della matrice analizzata.

Eseguire l'analisi dei campioni preparati seguendo la procedura (7.1.4) applicando le stesse condizioni operative utilizzate per la costruzione delle curve di taratura. Identificare i diversi composti presenti nel campione confrontando i tempi di ritenzione dei picchi presenti nei cromatogrammi del campione e delle soluzioni di riferimento, acquisiti nelle stesse condizioni cromatografiche. Misurare le aree di ciascun picco nei cromatogrammi ottenuti e calcolare la concentrazione di ciascun idrocarburo aromatico tramite confronto con le rette di taratura.

Tabella 1: Condizioni operative tipiche per l'analisi mediante spazio di testa statico

Temperatura campione	80°C
Tempo di termostatazione	20 minuti
Temperatura iniettore	200-250°C
Volume iniettato della fase vapore	100 µL (manualmente o mediante autocampionatore)

Verificare giornalmente, utilizzando almeno due soluzioni di riferimento diverse, che i risultati ottenuti siano entro la variabilità analitica definita al Paragrafo (9.1).

Tale metodo (riferimento esterno) presuppone la possibilità di introdurre quantità di campione molto esatte o comunque molto riproducibili (si presta pertanto all'uso di autocampionatori). In caso contrario è opportuno usare la tecnica del riferimento interno. In tal caso, aggiungere alle soluzioni di riferimento e ad ogni campione una soluzione di riferimento interno in concentrazione tale da avere un picco di area apprezzabile. È necessario un dosaggio del volume di riferimento interno estremamente riproducibile al fine di ottenere la medesima concentrazione in tutte le soluzioni.

Un esempio di cromatogramma di una soluzione mista di riferimento (20 µg/L, per ciascun analita) ottenuto con l'analisi mediante spazio di testa statico è riportato in Fig. 1.

7.2 Spazio di testa dinamico

7.2.1 Preparazione delle soluzioni di riferimento

Preparare una soluzione in metanolo contenente 0,2 mg/mL di ciascun idrocarburo aromatico da dosare. Tale soluzione, conservata a 4°C, è stabile un mese. Dalla soluzione precedente preparare una soluzione intermedia di 2 mg/L in metanolo, a partire dalla quale preparare almeno tre differenti soluzioni, in acqua, con cui allestire idonee rette di taratura per ogni composto. Esempio di concentrazioni utilizzabili per la taratura: 0,5 mg/L; 5 mg/L; 20 mg/L. Dette soluzioni vanno preparate al momento dell'uso.

7.2.2 Analisi

Le soluzioni di riferimento (almeno tre) e i campioni incogniti vengono introdotti direttamente, o mediante autocampionatore, nel dispositivo "Purge and trap" in volume opportuno, generalmente variabile da 5 mL a 10 mL. Applicare le condizioni riportate in Tab. 2. Tali condizioni hanno carattere esemplificativo e potranno essere ottimizzate dagli operatori in funzione della strumentazione disponibile e della matrice analizzata.

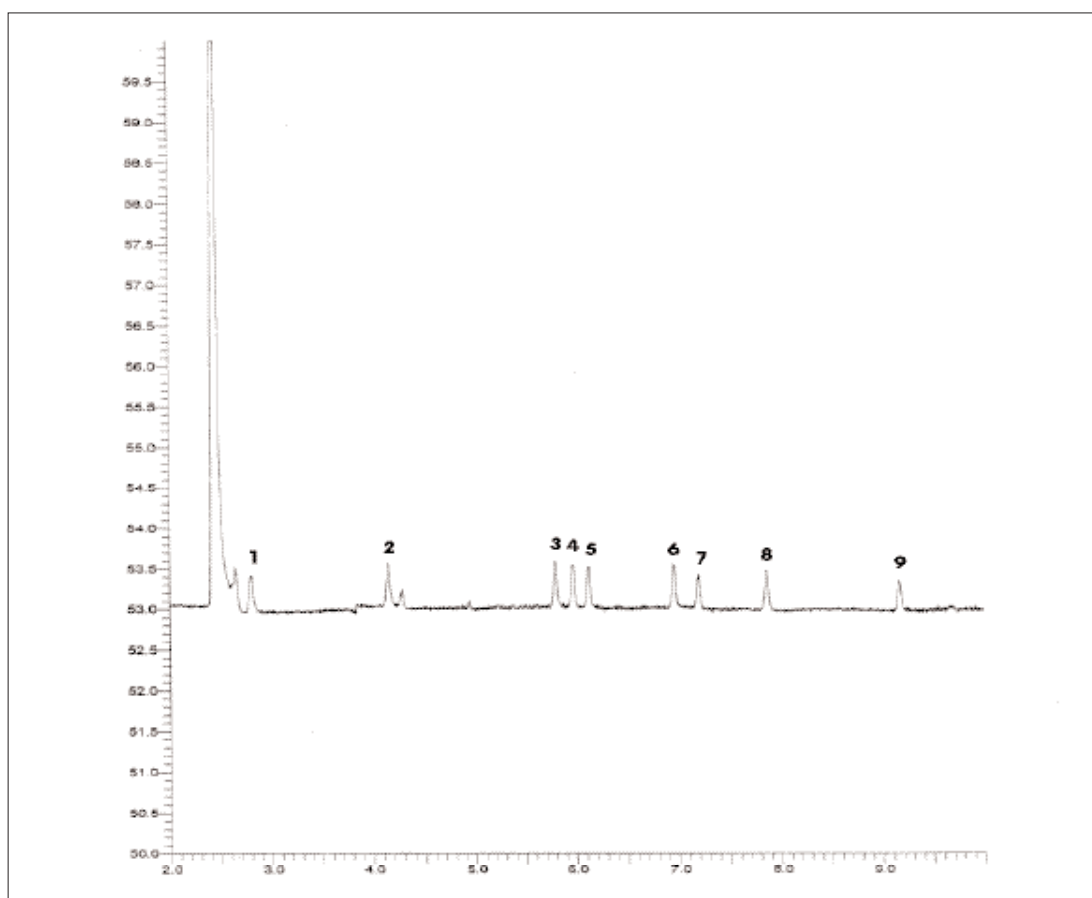


Figura 1: Gascromatogramma di una soluzione mista di riferimento (20 µg/L, per ciascun analita) analizzata con lo spazio di testa statico. Condizioni gascromatografiche. Precolonna di silice fusa senza fase, di pari diametro della colonna analitica; colonna gascromatografica: DB WAX, lunghezza: 30 m, diametro interno (i.d.)=0,32 mm, spessore film minimo=0,25 µm; temperatura iniettore: 250°C; temperatura del rivelatore (FID): 270°C; gas di trasporto: elio o idrogeno puri per gascromatografia; Programma di temperatura - TEMP1: 40°C; TIME1: 2 minuti; RATE1: 5°C/min; TEMP2: 100°C; TIME2: 0 minuti; RATE2: 10°C/min; TEMP3: 160°C; TIME3: 0 minuti.
1=benzene; 2=toluene; 3=etilbenzene; 4=p-xilene; 5=m-xilene; 6=cumene; 7=o-xilene; 8=n-propilbenzene; 9=stirene.

Identificare i diversi composti presenti nel campione confrontando i tempi di ritenzione dei picchi presenti nei cromatogrammi del campione e delle soluzioni di riferimento. Il campione e le soluzioni di riferimento devono essere iniettati nelle stesse condizioni. Misurare le aree di

Tabella 2: Condizioni operative tipiche per l'analisi mediante spazio di testa dinamico	
Temperatura iniziale trappola	Una temperatura bassa (meglio se <0°C, comunque non >25°C) garantisce una migliore possibilità di intrappolamento per gli analiti, soprattutto quelli più volatili.
"Purge"	In questa fase il gas passa attraverso il campione, contenuto in apposita ampolla, e gorgoglia alcuni minuti trasferendo gli analiti alla trappola; tempo di gorgogliamento consigliato: 12 minuti; flusso 40 mL/min.
"Dry purge"	Serve a rimuovere l'acqua o l'eventuale umidità dalla trappola. Durata: circa un minuto.
"Desorb preheat"	È usato per riscaldare la trappola ad alta temperatura in modo che gli analiti vengano rilasciati dall'adsorbente: in questa fase non vi è flusso di gas; temperatura consigliata 230°C.
Desorbimento	Gli analiti vengono desorbiti dalla trappola dal gas di trasporto e trasferiti al gascromatografo: in questa fase, della durata di circa 4 minuti, la temperatura consigliata è di 250°C.
Pulizia	In questa fase, in cui il gas passa attraverso il sistema per rimuovere eventuali residui di analiti e tracce di umidità rimaste nel sistema, la trappola è portata ad alta temperatura (280°C o superiore) per un tempo di almeno 15 minuti. Dopo questa fase si ritorna alle condizioni di "stand by".
Trappola	Tenax oppure carbone o altri materiali adsorbenti o loro miscele.
Gas di "make up"	Elio (30 mL/min).

ciascun picco nei cromatogrammi ottenuti e calcolare la concentrazione di ciascun idrocarburo aromatico tramite confronto con le rette di taratura.

Verificare giornalmente, utilizzando almeno due soluzioni di riferimento diverse, che i risultati ottenuti siano entro la variabilità analitica definita al Paragrafo (9.2).

Tale metodo (riferimento esterno) presuppone la possibilità di introdurre quantità di campione molto esatte o comunque molto riproducibili (si presta pertanto all'uso di autocampionatori). In caso contrario è opportuno usare la tecnica del riferimento interno. In tal caso, aggiungere alle soluzioni di riferimento e ad ogni campione una soluzione di riferimento interno in concentrazione tale da avere un picco di area apprezzabile. È necessario un dosaggio del volume di riferimento interno estremamente riproducibile al fine di ottenere la medesima concentrazione in tutte le soluzioni.

Un esempio di cromatogramma di una soluzione mista di riferimento (2 µg/L, per ciascun analita) ottenuto con l'analisi mediante spazio di testa dinamico è riportato in Fig. 2.

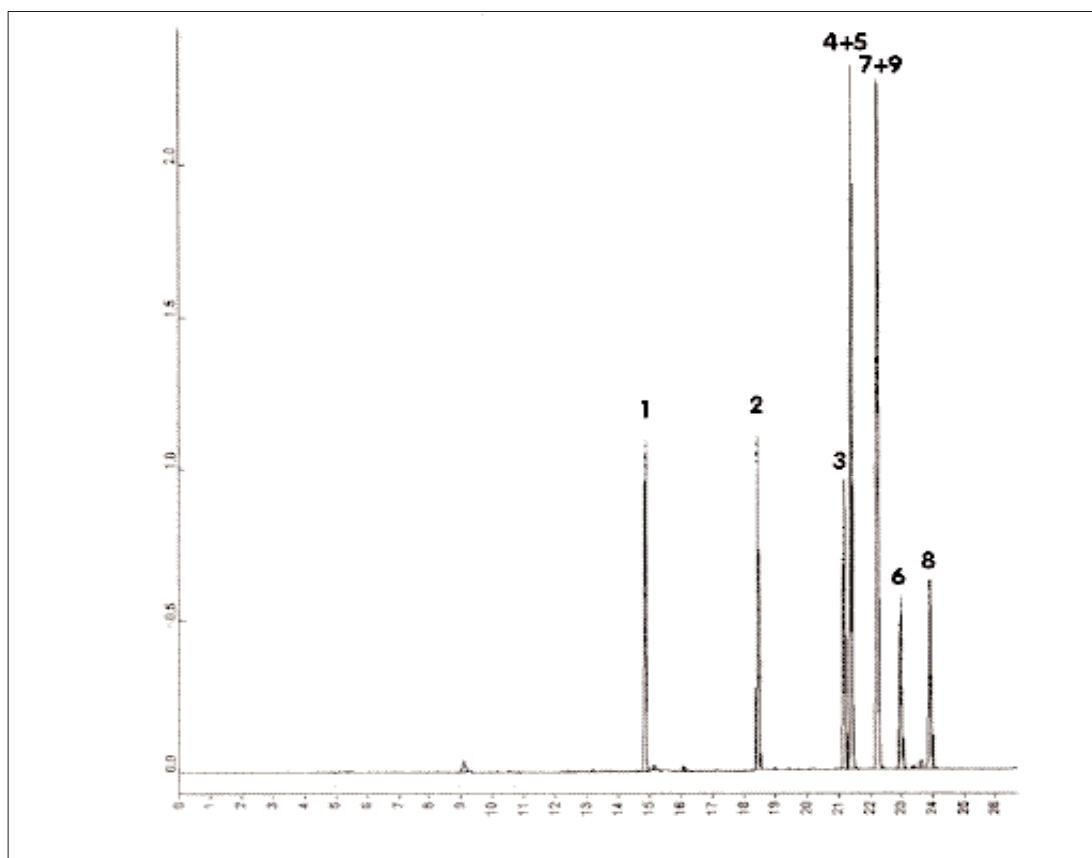


Figura 2: Gascromatogramma di una soluzione mista di taratura (2 µg/L, per ciascun analita) analizzata con lo spazio di testa dinamico. Condizioni gascromatografiche. Precolonna: di silice fusa senza fase, di pari diametro della colonna analitica; colonna gascromatografica: DB 624; lunghezza: 75 m; diametro interno (i.d.): 0,53 mm; temperatura del rivelatore (PID): 250°C; gas di trasporto: elio o idrogeno puri per gascromatografia; Programma di temperatura - TEMP1: 37°C; TIME1: 8 minuti; RATE1: 10°C/min; TEMP2: 160°C; TIME2: 12 minuti; RATE2: 20°C/min; TEMP3: 200°C; TIME3: 5,7 minuti.

1=benzene; 2=toluene; 3=etilbenzene; 4=p-xilene; 5=m-xilene; 6=cumene; 7=o-xilene; 8=n-propilbenzene; 9=stirene.

8. Calcoli

8.1 Metodo di taratura diretta o con riferimento esterno

Costruire le rette di taratura per i singoli analiti, accertandosi di operare nel campo linearità dello strumento, riportando in grafico l'area del picco del composto (A) in funzione della concentrazione del composto stesso ed interpolando i punti sperimentali con il metodo dei minimi quadrati. Ricavare il coefficiente angolare (a) e l'intercetta (b) della retta di taratura.

La concentrazione incognita di ogni composto è data dalla relazione:

$$C = \frac{A - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:

C = concentrazione (µg//L) del composto incognito;

A = area del picco dell'analita nella miscela incognita;

b = valore dell'intercetta della retta di taratura;

a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;

V_f = volume (mL) dell'estratto finale;

V_i = volume (mL) del campione acquoso.

8.2 Metodo con riferimento interno

Nel caso in cui si utilizzi il riferimento interno, riportare in grafico il rapporto area picco composto/area picco riferimento interno (A/A_{si}) in funzione della concentrazione del composto stesso. La concentrazione incognita di ogni composto è data dalla relazione:

$$C = \frac{A/A_{si} - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:

C = concentrazione ($\mu\text{g/L}$) del composto incognito;

A = area del picco dell'analita nella miscela incognita;

A_{si} = area del picco di riferimento interno nella miscela incognita;

b = valore dell'intercetta della retta di taratura;

a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;

V_f = volume (mL) dell'estratto finale;

V_i = volume (mL) del campione acquoso.

Accertarsi che la concentrazione del campione sia all'interno dell'intervallo di concentrazione utilizzato per la curva di taratura.

9. Qualità del dato

9.1 Spazio di testa statico

Prove effettuate ($n=5$) da tre laboratori su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti $20 \mu\text{g/L}$ di ciascun analita hanno fornito valori del coefficiente di variazione, $CV(\%) = (\text{scarto tipo}/\text{valore medio}) \cdot 100$, compresi tra 2,5% e 7,7% e recuperi tra il 91% e il 105%. Va tenuto presente che la precisione e l'accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice.

9.2 Spazio di testa dinamico

Prove effettuate ($n=5$) da cinque laboratori su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti $2 \mu\text{g/L}$ di ciascun analita hanno fornito valori del coefficiente di variazione compresi tra 2,0% e 3,4% e recuperi tra l'87% e il 100%. Va tenuto presente che la precisione e l'accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice.

Nota: si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".

Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

APPENDICE

A) Spazio di testa statico

Il sistema analitico può essere adattato alla contemporanea determinazione dei "solventi clo-

rurati". Si può utilizzare un gascromatografo bicolonna, oppure operare una scelta accurata di un'unica colonna di fase opportuna (ad esempio 94% metilpolisilossano e 6% cianopropilfenilpolisilossano), un doppio rivelatore di cui uno selettivo per le sostanze alogenate (ECD) ed uno universale (FID) e un sistema di elaborazione dati in grado di acquisire i dati da due rivelatori contemporaneamente. Nel caso si utilizzino due colonne, gli analiti in ingresso all'iniettore verranno ripartiti, dopo la precolonna e tramite "press-fit", alle due diverse colonne cromatografiche collegate ai due diversi rivelatori. In questo caso si ricorrerà all'iniezione di un volume maggiore di campione.

Nel caso si utilizzi una sola colonna, il rivelatore FID verrà montato in parallelo all'ECD: un partitore di flusso all'uscita della colonna cromatografica, suddividerà il flusso tra i due rivelatori permettendo di analizzare anche campioni contenenti quantità elevate di composti clorurati o di confermare sostanze per le quali il tempo di ritenzione non sia l'elemento univoco di riconoscimento.

B) Spazio di testa dinamico

Utilizzando una colonna di lunghezza superiore alle normali capillari impiegate per spazio di testa statico, e cioè da 75 m, e due rivelatori in parallelo, il rivelatore a fotoionizzazione PID e l'ELCD, si può fare riferimento a metodiche in grado di determinare contemporaneamente fino a 60 composti, tra idrocarburi aromatici e alogenoderivati.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): *"Standard methods for the examination of water and wastewater"*, XX Ed., (Washington, APHA).

U.S. Environmental Protection Agency (1991): *"Volatile organic compounds in water by purge and trap capillary column gas chromatography with photoionization and electrolytic conductivity detectors in series"*. Method 502.2 in *"Methods for the determination of organic compounds in finishing drinking water and raw source water"*. U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring and Support Lab., Cincinnati, Ohio.

5150. Solventi clorurati

Introduzione

I solventi clorurati fanno parte di una classe di composti organoalogenati ampiamente diffusi nell'ambiente, con serie conseguenze sulla salute umana a causa della presunta o accertata cancerogenicità di alcuni di questi (es. cloruro di vinile, cloroformio, tetraclorometano, 1,2-dicloroetano). L'inquinamento da solventi clorurati deriva dal loro massiccio impiego in campo civile e industriale (sgrassaggio di superfici metalliche, smacchiatura di tessuti, lavorazione di plastica, gomma, carta, produzione di aerosols, adesivi, vernici, sintesi di sostanze chimiche tra le quali i fumiganti) e da operazioni di smaltimento improprio. A causa della scarsa biodegradabilità di questi composti, gli effetti sull'ambiente di contaminanti sversati nel passato sono tuttora presenti.

Per la loro volatilità, queste sostanze possono contaminare le acque superficiali essenzialmente in prossimità dei siti di sversamento. Più facilmente interessano le falde acquifere, in quanto la densità di questi composti, generalmente più alta di quella dell'acqua, e la viscosità considerevolmente minore ne favoriscono il movimento verticale verso le falde. In numerose di queste i livelli di concentrazione raggiunti hanno largamente compromesso l'utilizzo della risorsa idrica.

È documentata, inoltre, la formazione di trialometani nei processi di disinfezione a seguito della reazione del cloro attivo con gli acidi umici e con altre sostanze organiche presenti nelle acque.

1. Principio del metodo

Il metodo prevede la determinazione di composti organoalogenati in campioni acquosi mediante gascromatografia accoppiata a spazio di testa statico (HS) ed a spazio di testa dinamico ("Purge & trap"). Soltanto i composti scarsamente solubili in acqua, relativamente volatili, tendono ad occupare lo spazio di testa e quindi possono essere trasferiti nel gascromatografo; in tal modo è possibile minimizzare eventuali interferenze e/o contaminazioni della colonna gascromatografica e del rivelatore.

1.1 Spazio di testa statico

L'analisi in spazio di testa statico consiste nell'analisi della fase vapore del campione, in equilibrio con la fase liquida, in una fiala ("vial") riscaldata a temperatura costante. La distribuzione dei composti organici tra le due fasi dipende dalla temperatura, dalla tensione di vapore dei singoli composti, dall'influenza della matrice del campione sui coefficienti di attività degli analiti e dal rapporto tra il volume dello spazio di testa e il volume di liquido nella fiala. Anche l'aggiunta di un sale solubile fino a saturazione può influire su detta distribuzione. Nel metodo proposto il campione acquoso, prelevato direttamente dal recipiente utilizzato per il prelievo, viene introdotto in fiale di adeguato volume, che vengono chiuse ermeticamente e poste in termostato ad una temperatura e per un tempo definiti. In condizioni operative tipiche, 100 μ L di fase vapore sono iniettati in un gascromatografo munito di una colonna contenente una fase stazionaria che consenta di isolare senza interferenze i diversi alogenoderivati presenti e successivamente di tollerare temperature elevate per lo spurgo di eventuali sostanze altobollenti coestratte.

La rivelazione dei composti è fatta con sorgente a ^{63}Ni (rivelatore a cattura di elettroni o ECD),

che possiede l'elevata sensibilità richiesta, elimina o riduce fortemente le interferenze da parte dei composti che non contengono alogeni e sopporta le temperature necessarie per evitare condensazioni di altobollenti eventualmente parzialmente coestratti. L'identificazione è fatta in base ai tempi di ritenzione dei diversi picchi, avendo cura di mantenere costante la portata del gas di trasporto e badando all'accuratezza delle temperature del forno individuate per l'analisi. Il calcolo delle concentrazioni è fatto tramite confronto fra le aree dei picchi ottenuti iniettando il campione e le aree dei picchi prodotti da soluzioni di riferimento.

1.2 Spazio di testa dinamico

L'analisi in spazio di testa dinamico, proposta in alternativa, consente di raggiungere elevate sensibilità. Il metodo prevede l'estrazione dalla matrice acquosa di sostanze organiche volatili, con bassa solubilità in acqua, mediante il gorgogliamento di un gas inerte in un determinato volume di campione. I composti così estratti vengono intrappolati in un apposito materiale adsorbente. Terminata l'estrazione, la trappola viene riscaldata e gli analiti sono trascinati da un flusso di gas inerte in testa alla colonna cromatografica, separati e quindi rivelati da un rivelatore ECD oppure dal rivelatore ELCD (o rivelatore a effetto Hall). La risposta di quest'ultimo è indipendente, a differenza di quella del primo, dal numero di alogeni presenti nella molecola. Successivamente gli analiti vengono identificati mediante i tempi di ritenzione e quantificati in modo del tutto analogo al metodo precedente. La disponibilità di un rivelatore di massa permette un'ulteriore più sicura identificazione degli analiti.

Con opportune scelte tecniche (vedi Appendice), il sistema analitico può essere reso idoneo alla determinazione contemporanea di "solventi organici aromatici" e "solventi clorurati".

2. Campo di applicazione

Il metodo descritto, nelle due diverse modalità, consente la determinazione in acque di scarico e superficiali dei composti riportati in Tab. 1.

Tabella 1: Sostanze determinate

vinilcloruro
cloroformio
1,1,1-tricloroetano
tetraclorometano
tricloroetilene
tetracloroetilene
1,1-dicloroetilene
1,2-dicloroetano
cis- e trans-dicloroetilene
1,2-dicloropropano
1,1,2-tricloroetano
1,1,2,2-tetracloroetano

Il metodo può essere esteso anche ad altri composti alogenati che abbiano punti di ebollizione comparabili quali, ad esempio, il clorodibromometano, il diclorobromometano e il bromoformio.

Il metodo dinamico si presta anche alla determinazione di composti più altobollenti quali l'1,2,4-triclorobenzene e l'esaclorobutadiene.

Nel metodo statico le caratteristiche del rivelatore impiegato (ECD), sensibile al numero di alogeni presenti nella molecola, condiziona il campo di applicazione del metodo. Infatti, mentre i composti pluri-alogenati sono generalmente rivelabili anche

in concentrazioni molto basse (a partire da 0,1 µg/L), i composti meno alogenati hanno limiti di rivelabilità sensibilmente superiori (anche in questo caso variabili da composto a composto e che possono arrivare a qualche decina di µg/L).

Il metodo dinamico è in grado di rivelare concentrazioni di 0,1 µg/L per ogni singolo analita (in qualche caso anche inferiori). Per la sua elevata sensibilità questo metodo è applicabile anche alle acque sotterranee.

3. Interferenze e cause di errore

Il rivelatore selettivo a cattura di elettroni minimizza gli effetti di sostanze interferenti. Le colonne capillari consentono di ottenere, generalmente, una buona sensibilità ed affidabilità nella determinazione degli analiti in oggetto. L'uso di tali colonne con annessa precolonna permette infatti una buona separazione dei picchi delle sostanze da analizzare da quelli delle sostanze interferenti. La separazione può essere migliorata aumentando la lunghezza della colonna, con conseguente allungamento dei tempi di analisi.

La presenza di composti altobollenti parzialmente coestratti può creare difficoltà durante l'analisi allungandone sensibilmente i tempi. Per rimuovere tali composti è necessario elevare la temperatura della colonna cromatografica fino al massimo valore consentito dalla fase stazionaria impiegata e attendere che la linea di base si stabilizzi prima di passare al raffreddamento del forno e all'introduzione del campione successivo.

La presenza di cloro libero residuo nelle acque, proveniente da trattamenti di disinfezione, può alterare sensibilmente i risultati analitici a causa della possibile formazione di trihalometani. La presenza di cloro può essere ridotta mediante l'aggiunta di piccole quantità di un riducente al momento del campionamento (ad esempio tiosolfato di sodio).

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento dell'acqua da analizzare deve essere effettuato in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Si consiglia, inoltre, l'uso di bottiglie di vetro, chiuse con un tappo a smeriglio di vetro, accuratamente pulite per evitare contaminazioni del campione e risciacquate con l'acqua da analizzare immediatamente prima dell'uso. Non filtrare l'acqua ed evitare ogni operazione che faciliti il degasaggio dei composti organici volatili disciolti.

Riempire la bottiglia fino all'orlo e tappare subito, evitando di lasciare spazi gassosi nei quali possano passare i composti più volatili che andrebbero perduti all'apertura della bottiglia fornendo risultati in difetto.

Le analisi devono essere effettuate al più presto e in ogni caso non oltre 48 ore dal prelievo, conservando il campione in frigorifero a 4°C nel periodo d'attesa.

5. Apparecchiature

5.1 *Bottiglie di vetro per la raccolta del campione, con tappo a tenuta (capacità almeno 100 mL).*

5.2 *Camera ermetica a guanti, di dimensioni appropriate per manipolazione di riferimenti e campioni.*

Nella determinazione dei solventi organici clorurati nelle acque di scarico le quantità in gioco sono spesso tali per cui si può evitare l'uso della camera a guanti e limitarsi semplicemente a porre attenzione all'eventuale presenza di organoalogenati dispersi nell'atmosfera del laboratorio dove si estraggono i campioni. Preparare le soluzioni di riferimento sotto una cappa ben ventilata. A causa della loro tossicità utilizzare gli idonei dispositivi di protezione individuali (ad es. respiratore) quando si usano questi composti allo stato puro.

5.3 *Flaconcini di vetro ("vials"), adatti per la tecnica in spazio di testa statico, di idonea capacità (10-20 mL), con tappo con ghiera di alluminio e guarnizione in silicone teflonata, a chiusura ermetica.*

5.4 *Matracci o palloni tarati di vario volume, per la preparazione e la diluizione delle soluzioni a concentrazione nota dei diversi composti organoalogenati e per la preparazione delle soluzioni di riferimento per la taratura.*

- 5.5 *Pipette tarate* di vario volume, a doppia tacca, classe A.
- 5.6 *Spatola d'acciaio* per pesate di sostanze solide.
- 5.7 *Microsiringhe* per liquidi da 10 μ L, 50 μ L, 250 μ L.
- 5.8 *Siringa per gas* con ago sostituibile da 100-1000 μ L (in assenza di autocampionatore).
- 5.9 *Pinze* per chiusura ed apertura vials.
- 5.10 *Bilancia tecnica*, risoluzione 0,1 g.
- 5.11 *Bilancia analitica*, risoluzione 0,1 mg.
- 5.12 *Gasromatografo*, dotato di un forno per le colonne di sufficiente capacità e di un rivelatore a cattura di elettroni ed eventualmente dotato di autocampionatore idoneo a lavorare alla temperatura selezionata per la termostatazione. Le temperature di iniettore, forno e rivelatore debbono essere controllabili in modo indipendente.
- 5.13 *Colonna cromatografica*: capillare di vetro o silice fusa con fase stazionaria di media polarità, di opportuna lunghezza e diametro interno; precolonna di pari diametro.
- 5.14 *Termostato* indipendente per campioni e soluzioni di riferimento, nei casi in cui il gasromatografo non sia dotato di autocampionatore termostatato.
- 5.15 *Elaboratore di dati cromatografici* per la misura delle aree dei picchi ed eventualmente per l'impiego di un metodo di taratura con riferimento esterno o interno, con possibilità di stampa di dati e cromatogrammi.

Per il metodo in spazio di testa dinamico oltre alla vetreria, microsiringhe, colonne ed accessori cromatografici già indicati si ricorre a:

- 5.16 *Siringhe monouso* da 5 e 10 mL.
- 5.17 *Campionatore "Purge and trap"* manuale o automatico.
- 5.18 *Trappola* costituita da idoneo materiale adsorbente.
- 5.19 *Gasromatografo* dotato di rivelatore ECD oppure ELCD.

La vetreria e i materiali impiegati devono essere riservati alla procedura analitica in oggetto. La vetreria di cui ai punti 5.1, 5.3, 5.4 dopo il lavaggio va trattata a 180-200°C per almeno 3 ore e raffreddata prima dell'uso; i tappi e le guarnizioni lavati in n-pentano e asciugati in stufa a 90°C. Le fiale devono essere trattate a 200°C per almeno 3 ore; nel caso di riscontro di composti altobollenti, le fiale andranno trattate a temperature superiori, anche 400°C, ed eventualmente con miscela cromica. Far passare un gas inerte attraverso le siringhe per campionamento gas dopo ogni iniezione.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua utilizzata deve essere esente da sostanze organiche.

- 6.1 *Elio o idrogeno puro per gasromatografia*, usato come gas di trasporto, eventualmente passato attraverso una trappola a carbone attivo e una trappola a setacci molecolari

tipo 5A. Un'ulteriore purificazione può essere fatta tramite passaggio in una trappola per l'eliminazione delle tracce d'ossigeno.

6.2 *Carbone attivo* per l'eliminazione delle impurezze gassose o allo stato di vapore. Va conservato in modo da proteggerlo dall'adsorbimento di impurezze presenti nell'ambiente del laboratorio.

6.3 *Setacci molecolari* tipo 5A attivati a 350°C per alcune ore in corrente di gas inerte.

6.4 *Cloruro di sodio (NaCl)*

6.5 *Alcol metilico (CH₃OH)*

6.6 *Tiosolfato di sodio (Na₂S₂O₃)*

6.7 *Composti alogenati* di elevata purezza per la preparazione delle soluzioni di riferimento. Verificare che ogni composto dia un solo picco cromatografico nelle condizioni di lavoro previste per le soluzioni di riferimento. In considerazione della composizione molto variabile dei campioni d'acqua da analizzare, è opportuno disporre anche di soluzioni di riferimento di singoli composti oltre che delle miscele.

6.8 *Trifluorobenzene*, oppure *1-Cloro-2-Fluorobenzene*, oppure altra sostanza idonea ad essere usata quale riferimento interno per determinazioni sia di composti organoalogenati che di idrocarburi aromatici.

6.9 *Alcol n-Propilico* (per spazio di testa dinamico con rivelatore ELCD).

7. Procedimento

7.1 *Spazio di testa statico*

7.1.1 Preparazione delle soluzioni concentrate (10 mg/mL di ciascun composto organoalogenato)

Per determinare le concentrazioni dei diversi composti organoalogenati presenti nel campione in esame è consigliabile preparare soluzioni a concentrazione nota dei diversi composti in acqua e applicare a queste la stessa tecnica di preparazione usata per campioni incogniti (7.1.3). Pesare 100 mg di ciascun composto da dosare trasferendo con una microsiringa un'aliquota dello standard commerciale in palloni tarati da 10 mL contenenti alcuni millilitri di alcol metilico (6.5), in modo da limitare l'evaporazione del composto (*).

Il volume dell'aliquota da prelevare si può calcolare dal valore della densità del riferimento utilizzato. Portare a volume con alcol metilico (6.5) mescolando con cura. Queste soluzioni, conservate in frigorifero, sono stabili un mese.

7.1.2 Preparazione delle soluzioni di riferimento

Preparare una soluzione in metanolo contenente 0,2 mg/mL di ciascun composto organoalogenato da dosare, partendo dalle soluzioni concentrate singole (7.1.1) oppure da soluzioni disponibili in commercio. Tale soluzione, conservata a 4°C, è stabile un mese. Dalla soluzione precedente preparare una soluzione intermedia di 2 mg/L in metanolo e da questa,

(*) La scarsa stabilità delle soluzioni concentrate e la necessità di procedere alla ripreparazione delle stesse una volta al mese suggerisce di preparare 10 mL (invece di 100 mL) di dette soluzioni al fine di minimizzare il volume di residui da smaltire. Nel caso del cloruro di vinile, per evitare di applicare complesse procedure nella preparazione in condizioni di sicurezza della soluzione concentrata a partire dal prodotto puro si ricorre all'utilizzo di soluzioni commerciali a concentrazione nota dell'analita in metanolo.

mediante diluizioni successive, almeno tre soluzioni di taratura, in acqua, a differenti concentrazioni. Le concentrazioni verranno scelte in modo che il livello più basso coincida con il limite di quantificazione(*) e gli altri due cadano all'interno del campo di linearità delle misure. Le concentrazioni dei singoli analiti destinati all'analisi con rivelatore ECD saranno diversificate in base al loro grado di alogenazione e, conseguentemente, al loro grado di rivelabilità (vedi Capitolo 2). Dette soluzioni vanno preparate al momento dell'uso.

7.1.3 Preparazione del campione

Introdurre un idoneo volume di campione (generalmente da 5 a 15 mL) in una "vial" da 10 o 20 mL, in modo che il volume di liquido sia circa i 3/4 del totale, prelevandola direttamente dal recipiente utilizzato per il prelievo. L'aggiunta di un sale (cloruro di sodio) fino a saturazione può favorire il trasferimento degli analiti in fase vapore. In tal caso agitare vigorosamente per favorire la dissoluzione del sale. Chiudere, quindi, la "vial" ermeticamente e termostatare alla temperatura e per il tempo predeterminati.

7.1.4 Analisi

Analizzare almeno tre soluzioni di riferimento, seguendo la procedura indicata in (7.1.3) per la preparazione del campione e applicando le condizioni riportate in Tab. 1. Tali condizioni hanno carattere esemplificativo e potranno essere ottimizzate dagli operatori in funzione della strumentazione disponibile e della matrice analizzata.

Tabella 1: Condizioni operative tipiche per l'analisi mediante spazio di testa statico

Temperatura campione	80 °C
Tempo di termostatazione	20 minuti
Temperatura iniettore	200-250 °C
Volume iniettato della fase vapore	100 µL (manualmente o mediante autocampionatore)

Eseguire l'analisi dei campioni preparati seguendo la procedura (7.1.3) applicando le stesse condizioni operative utilizzate per la costruzione delle curve di taratura. Identificare i diversi composti presenti nel campione confrontando i tempi di ritenzione dei picchi presenti nel cromatogramma del campione e delle soluzioni di taratura, acquisiti nelle stesse condizioni cromatografiche. Misurare le aree di ciascun picco nei cromatogrammi ottenuti e calcolare la concentrazione di ciascun composto organoalogenato tramite confronto con le rette di taratura.

Verificare giornalmente, utilizzando almeno due delle soluzioni di riferimento, che i risultati ottenuti siano entro la variabilità analitica definita al Paragrafo (9.1).

Tale metodo (riferimento esterno) presuppone la possibilità di introdurre quantità di campione molto esatte o comunque molto riproducibili (si presta pertanto all'uso di autocampionatori). In caso contrario è opportuno usare la tecnica del riferimento interno. In tal caso, aggiungere alle soluzioni di riferimento e di controllo e ad ogni campione un riferimento interno in concentrazione tale da avere un picco di area apprezzabile. È necessario un dosaggio del volume di riferimento interno estremamente riproducibile al fine di ottenere la medesima concentrazione in tutte le soluzioni.

Un esempio di cromatogramma di una soluzione per la taratura con concentrazioni dei singoli analiti variabili a seconda del grado di clorurazione, ottenuto con l'analisi mediante spazio di testa statico è riportato in Fig. 1.

(*) Per limite di quantificazione si intende la minima quantità rivelabile e calcolabile con accettabile precisione nelle condizioni di prova e pertanto il valore minimo per il quale è possibile esprimere un risultato.

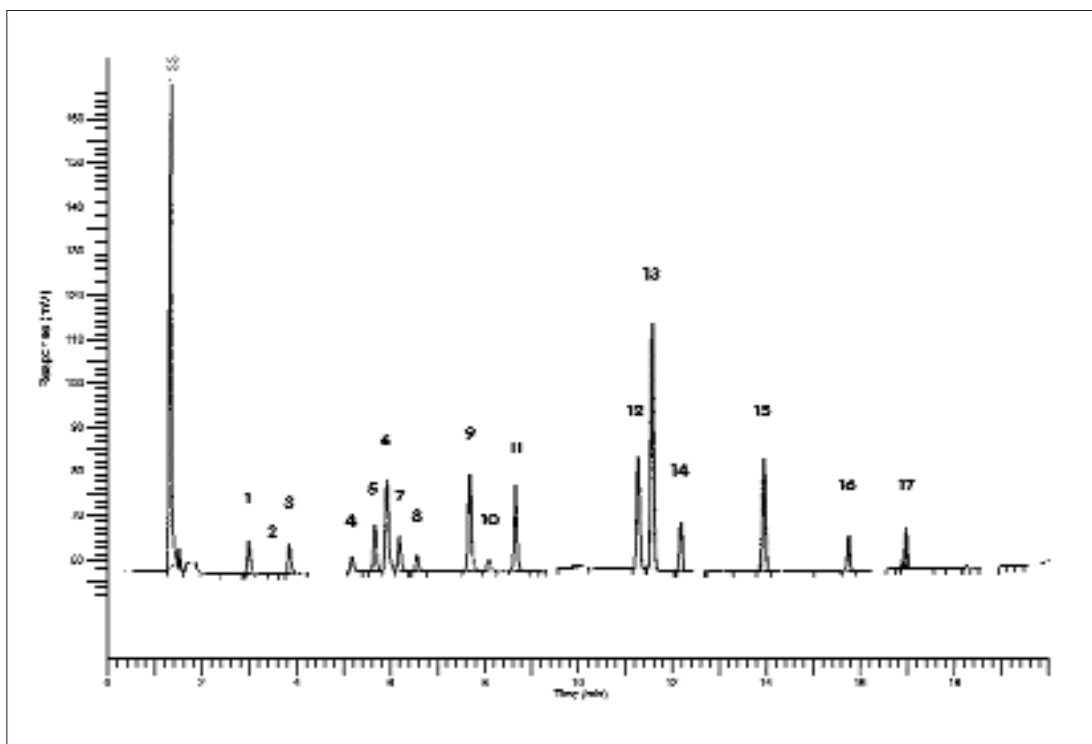


Figura 1: Gascromatogramma di una soluzione di riferimento analizzata con lo spazio di testa statico. Condizioni gascromatografiche. Precolonna di silice fusa senza fase, di pari diametro della colonna analitica, colonna gascromatografica: DB 624, lunghezza=30 m, diametro interno (i.d)=0,32 mm, spessore film minimo=1,8 μ m; temperatura iniettore: 250°C; temperatura del rivelatore (ECD): 350°C; gas di trasporto: elio o idrogeno puri per gascromatografia; Programma di temperatura - TEMP1: 40°C; TIME1: 2 minuti; RATE1: 5°C/min; TEMP2: 100°C; TIME2: 0 minuti; RATE2: 10°C/min; TEMP3: 160°C; TIME3: 0 minuti.

1=1,1-dicloroetilene (4 μ g/L); 2=diclorometano (impurezza); 3=trans-1,2-dicloroetilene (100 μ g/L); 4=cis-1,2-dicloroetilene (100 μ g/L); 5=cloroformio (2 μ g/L); 6=1,1,1-tricloroetano (2 μ g/L); 7=tetracloruro di carbonio (0,2 μ g/L); 8=1,2-dicloroetano (100 μ g/L); 9=tricloroetilene (2 μ g/L); 10=1,2-dicloropropano (100 μ g/L); 11=diclorobromometano (2 μ g/L); 12=1,1,2-tricloroetano (100 μ g/L); 13=tetracloroetilene (2 μ g/L); 14=clorodibromometano (2 μ g/L); 15=1,1,1,2-tetracloroetano (2 μ g/L); 16=bromoformio (4 μ g/L); 17=1,1,2,2-tetracloroetano (4 μ g/L).

7.2 Spazio di testa dinamico

7.2.1 Preparazione delle soluzioni di riferimento

Preparare una soluzione in metanolo contenente 0,2 mg/mL di ciascun composto organoalogenato da dosare, partendo dalle soluzioni concentrate singole (7.1.1) oppure da soluzioni disponibili in commercio. Tale soluzione, conservata a 4°C, è stabile un mese. Dalla soluzione precedente preparare una soluzione intermedia di 2 mg/L in metanolo e da questa, mediante diluizioni successive, almeno tre soluzioni di taratura, in acqua, a differenti concentrazioni. Le concentrazioni verranno scelte in modo che il livello più basso coincida con il limite di quantificazione (*) e gli altri due cadano all'interno del campo di linearità delle misure. Le concentrazioni dei singoli analiti destinati all'analisi con rivelatore ECD saranno diversificate in base al loro grado di alogenazione e, conseguentemente, al loro grado di rivelabilità (vedi Capitolo 2). Dette soluzioni vanno preparate al momento dell'uso.

7.2.2 Analisi

Le soluzioni di riferimento (almeno tre) e i campioni incogniti vengono introdotti direttamen-

(*) Per limite di quantificazione si intende la minima quantità rivelabile e calcolabile con accettabile precisione nelle condizioni di prova e pertanto il valore minimo per il quale è possibile esprimere un risultato.

te, o mediante autocampionatore, nel dispositivo "Purge and trap" in volume opportuno, generalmente variabile da 5 mL a 10 mL. Applicare le condizioni riportate in Tab. 2. Tali condizioni hanno carattere esemplificativo e potranno essere ottimizzate dagli operatori in funzione della strumentazione disponibile e della matrice analizzata.

Identificare i diversi composti presenti nel campione confrontando i tempi di ritenzione dei picchi presenti nei cromatogrammi del campione e delle soluzioni di riferimento, acquisiti nelle stesse condizioni cromatografiche. Misurare le aree di ciascun picco nei cromatogrammi ottenuti e calcolare la concentrazione di ciascun composto organoalogenato tramite confronto con le rette di taratura.

Verificare giornalmente, utilizzando almeno due delle soluzioni di riferimento, che i risultati ottenuti siano entro la variabilità analitica definita al Paragrafo (9.2).

Tale metodo (riferimento esterno) presuppone la possibilità di introdurre quantità di campione molto esatte o comunque molto riproducibili (si presta pertanto all'uso di autocampionatori). In caso contrario è opportuno usare la tecnica del riferimento interno. In tal caso, aggiungere alle soluzioni di riferimento e di controllo e ad ogni campione una soluzione di riferimento interno in concentrazione tale da avere un picco di area apprezzabile. È necessario un dosaggio del volume di riferimento interno estremamente riproducibile al fine di ottenere la medesima concentrazione in tutte le soluzioni.

Tab. 2 - Condizioni operative tipiche per l'analisi mediante spazio di testa dinamico

Temperatura iniziale trappola	Una temperatura bassa (meglio se <0°C, comunque non >25°C) garantisce una migliore possibilità di intrappolamento per gli analiti, soprattutto quelli più volatili
"Purge"	In questa fase il gas passa attraverso il campione, contenuto in apposita ampolla, e gorgoglia alcuni minuti trasferendo gli analiti alla trappola; tempo di gorgogliamento consigliato: 12 minuti; flusso 40 mL/min
"Dry purge"	Serve a rimuovere l'acqua o l'eventuale umidità dalla trappola. Durata: circa un minuto
"Desorb preheat"	È usato per riscaldare la trappola ad alta temperatura in modo che gli analiti vengano rilasciati dall'adsorbente: in questa fase non vi è flusso di gas; temperatura consigliata 230°C
Desorbimento	Gli analiti vengono desorbiti dalla trappola dal gas di trasporto e trasferiti al gascromatografo: in questa fase, della durata di circa 4 minuti, la temperatura consigliata è di 250°C
Pulizia	In questa fase, in cui il gas passa attraverso il sistema per rimuovere eventuali residui di analiti e tracce di umidità rimaste nel sistema, la trappola è portata ad alta temperatura (280°C o superiore) per un tempo di almeno 15 minuti. Dopo questa fase si ritorna alle condizioni di "stand by"
Trappola	Tenax oppure carbone o altri materiali adsorbenti o loro miscele
Gas di reazione	Idrogeno (30 mL/min)
Gas di "make up"	Elio (30 mL/min)
Flusso alcol n-propilico:	0,5 mL/min

Un esempio di cromatogramma di una soluzione di riferimento (2 µg/L per ciascun analita) ottenuto con l'analisi mediante spazio di testa dinamico è riportato in Fig. 2.

8. Calcoli

8.1 Metodo di taratura diretta o con riferimento esterno

Costruire le rette di taratura per i singoli analiti, accertandosi di operare nel campo linearità

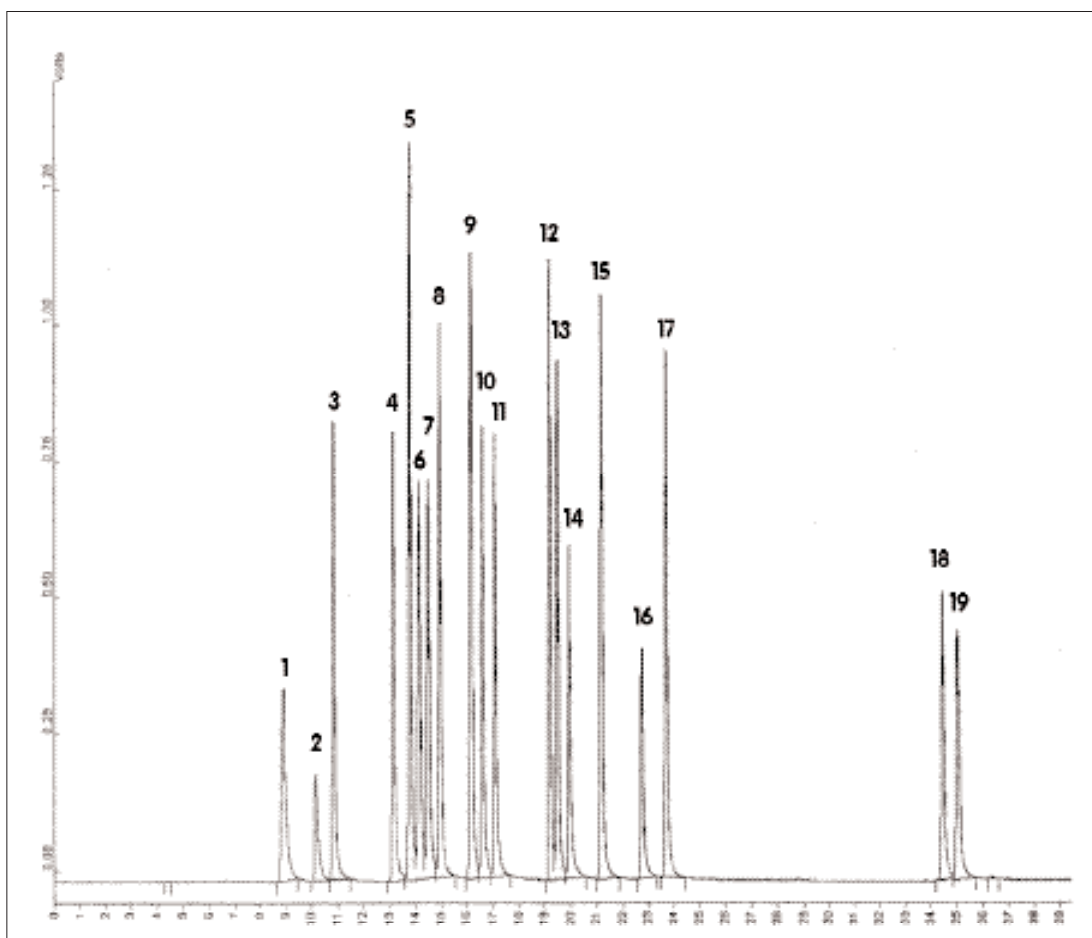


Figura 2: Gascromatogramma di una soluzione di taratura (2 µg/L per ciascun analita) analizzata con lo spazio di testa dinamico. Condizioni gascromatografiche. Precolonna di silice fusa senza fase, di pari diametro della colonna analitica; colonna gascromatografica=DB 624; lunghezza: 75 m, diametro interno (i.d.)=0,53 mm, spessore film = 3 µm; temperatura del rivelatore (ELCD): 250°C; gas di trasporto: elio o idrogeno puri per gascromatografia; Programma di temperatura - TEMP1: 37°C; TIME1: 8 minuti; RATE1: 10°C/min; TEMP2: 160°C; TIME2: 12 minuti; RATE2: 20°C/min; TEMP3: 200°C; TIME3: 5,7 minuti.
 1=1,1-dicloroetilene; 2=diclorometano; 3=trans-1,2-dicloroetilene; 4=cis-1,2-dicloroetilene; 5=cloroformio; 6=1,1,1-tricloroetano; 7=tetracloruro di carbonio; 8=1,2-dicloroetano; 9=tricoloroetilene; 10=1,2-dicloropropano; 11=diclorobromometano; 12=1,1,2-tricloroetano; 13=tetracloroetilene; 14=clorodibromometano; 15=1,1,1,2-tetracloroetano; 16=bromoformio; 17=1,1,2,2-tetracloroetano; 18=1,2,4-triclorobenzene, 19=esaclorobutadiene.

dello strumento, riportando in grafico l'area del picco del composto (A) in funzione della concentrazione del composto stesso ed interpolando i punti sperimentali con il metodo dei minimi quadrati. Ricavare il coefficiente angolare (a) e l'intercetta (b) della retta di taratura. La concentrazione incognita di ogni composto (C), espressa in µg/L, è data dalla relazione:

$$C = \frac{A - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:

- C = concentrazione (mg/L) dell'analita;
- A = area del picco dell'analita nella miscela incognita;
- b = valore dell'intercetta della retta di taratura;
- a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
- V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
- V_i = volume (mL) del campione acquoso.

8.2 Metodo con riferimento interno

Nel caso in cui si utilizzi il riferimento interno, riportare in grafico il rapporto area picco composto/area picco riferimento interno (A/A_{si}) in funzione della concentrazione del composto stesso. La concentrazione incognita di ogni composto, è data dalla relazione:

$$C = \frac{A/A_{si} - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:

C = concentrazione ($\mu\text{g/L}$) dell'analita;

A = area del picco dell'analita nella miscela incognita;

A_{si} = area del picco del riferimento interno nella miscela incognita;

b = valore dell'intercetta della retta di taratura;

a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;

V_f = volume (mL) dell'estratto finale;

V_i = volume (mL) del campione acquoso.

Accertarsi che la concentrazione del campione sia all'interno dell'intervallo di concentrazione utilizzato per la curva di taratura.

9. Qualità del dato

9.1 Spazio di testa statico

Prove effettuate da quattro laboratori su 5 repliche di soluzioni di acqua deionizzata contenenti $10 \mu\text{g/L}$ di ciascun analita hanno fornito valori del coefficiente di variazione, $CV(\%) = (\text{scarto tipo/valore medio}) \cdot 100$, compresi tra 2,2% e 10% e recuperi tra il 98% e il 102%. Va tenuto presente che la precisione e l'accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice.

9.2 Spazio di testa dinamico

Prove effettuate da tre laboratori su 5 repliche di soluzioni di acqua deionizzata contenenti $2 \mu\text{g/L}$ di ciascun analita hanno fornito valori del coefficiente di variazione compresi tra 2,4% e 14,6% e recuperi tra l'86% e il 107%. Su soluzioni sintetiche contenenti $10 \mu\text{g/L}$ il coefficiente di variazione era compreso tra 1,1% e 5,6% e il recupero tra l'84% e il 109%. Va tenuto presente che la precisione e l'accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice.

Nota: si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".

Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

APPENDICE**A) Spazio di testa statico**

Il sistema analitico può essere adattato alla contemporanea determinazione dei "solventi aromatici". Si può utilizzare un gascromatografo bicolonna, oppure operare una scelta accurata di un'unica colonna di fase opportuna (ad esempio 94% metilpolisilossano e 6% cianopropilfenilpolisilossano), un doppio rivelatore di cui uno selettivo per le sostanze alogenate (ECD) ed uno universale (FID) e un sistema di elaborazione dati in grado di acquisire i dati da due rivelatori contemporaneamente. Nel caso si utilizzino due colonne, gli analiti in ingresso all'iniettore verranno ripartiti, dopo la precolonna e tramite "press-fit", alle due diverse colonne cromatografiche collegate ai due diversi rivelatori. In questo caso si ricorrerà all'iniezione di un volume maggiore di campione.

Nel caso si utilizzi una sola colonna, il rivelatore FID verrà montato in parallelo all'ECD: un partitore di flusso all'uscita della colonna cromatografica, suddividerà il flusso tra i due rivelatori permettendo di analizzare anche campioni contenenti quantità elevate di composti clorurati o di confermare sostanze per le quali il tempo di ritenzione non sia l'elemento univoco di riconoscimento.

B) Spazio di testa dinamico

Utilizzando una colonna di lunghezza superiore alle normali capillari impiegate per spazio di testa statico, e cioè da 75 m, e due rivelatori in parallelo, il rivelatore a fotoionizzazione PID e l'ELCD, si può fare riferimento a metodiche in grado di determinare contemporaneamente fino a 60 composti, tra idrocarburi aromatici e alogenoderivati.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): *"Standard methods for the examination of water and wastewater"*, XX Ed., (Washington, APHA).

U.S.EPA. (1991): *"Volatile organic compounds in water by purge and trap capillary column gas chromatography with photoionization and electrolytic conductivity detectors in series"*. Method 502.2 in *"Methods for the determination of organic compounds in finishing drinking water and raw source water"*. U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring and Support Lab., Cincinnati, Ohio.

5160. Sostanze oleose (Grassi e oli animali e vegetali; idrocarburi totali)

Introduzione

La presenza di oli e grassi animali e vegetali è rilevante negli effluenti dell'industria alimentare (caseifici, mattatoi, oleifici, frantoi) e nei liquami di origine civile. Idrocarburi di origine petrolifera si ritrovano negli scarichi di industrie petrolifere e petrolchimiche in concentrazioni più o meno significative a seconda della tipologia del processo produttivo e dell'età degli impianti. La loro presenza nei corpi idrici è legata per lo più a sversamenti accidentali.

Nella determinazione delle sostanze oleose totali, degli idrocarburi totali e dei grassi e oli animali e vegetali non viene misurata la quantità assoluta di una sostanza specifica, bensì quella di un gruppo di sostanze le cui caratteristiche di solubilità in un determinato solvente organico sono simili.

Durante il procedimento di estrazione con solvente passano nella fase organica idrocarburi, acidi grassi, trigliceridi, tensioattivi, oli e ogni altro composto estraibile con il solvente nelle condizioni stabilite nel metodo. Da questa precisazione deriva che le definizioni di "sostanze oleose totali", "oli e grassi animali e vegetali" e "idrocarburi totali" dipendono dal metodo di analisi impiegato.

Quando bisogna distinguere tra oli e grassi animali e vegetali e idrocarburi totali è necessario operare nel modo seguente:

- effettuare la determinazione quantitativa delle sostanze oleose totali;
- effettuare la determinazione quantitativa degli idrocarburi totali;
- fare la differenza tra le rispettive concentrazioni di sostanze oleose totali e di idrocarburi totali.

Il valore ottenuto rappresenta la concentrazione di oli e grassi animali e vegetali.

Vengono proposti due metodi, uno gravimetrico per acque fortemente inquinate (Metodo A) ed uno spettrofotometrico all'infrarosso (Metodo B) per basse concentrazioni. Il solvente organico utilizzato per l'estrazione è rappresentato da una miscela di n-esano (80%) e metil-tert-butiletere (20%) nel caso della determinazione gravimetrica, mentre per il metodo all'infrarosso è indispensabile disporre di solventi che non assorbano nella regione di interesse. Composti come tetracloroetilene, tetracloruro di carbonio e 1,1,2-triclorotrifluoroetano rispondono al suddetto requisito ma il loro impiego costituisce un rischio a livello sanitario e/o ambientale. Nel presente metodo si è scelto di ricorrere all'1,1,2-triclorotrifluoroetano in accordo con quanto previsto da altre metodologie validate (Standard Methods, ASTM). Tuttavia in letteratura esistono altri metodi normati quali ad esempio il metodo ISO 9377-2 (2000), basato sull'impiego della gascromatografia.

Rispetto al metodo gravimetrico, la procedura all'infrarosso non prevedendo alcuna evaporazione dell'estratto consente di determinare eventuali idrocarburi volatili presenti nel campione.

METODO A – Determinazione gravimetrica

METODO A1 – Sostanze oleose totali

1. Principio del metodo

Il campione in esame viene acidificato ed estratto con una miscela di n-esano (80%) e metil-tert-butiletere (20%). L'estratto, raccolto in un recipiente ed evaporato, fornisce un residuo che viene determinato per via gravimetrica.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali, di scarico e di mare per concentrazioni in sostanze oleose superiori a 10 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Durante il procedimento di estrazione le sostanze si ripartiscono tra le due fasi in ragione del proprio coefficiente di ripartizione tra la miscela di solventi (6.6) e l'acqua, da cui può derivare una sottostima. La doppia estrazione serve a migliorare il recupero.

La rimozione del solvente comporta la perdita per evaporazione delle sostanze più leggere; la perdita che subiscono in questa operazione i distillati del petrolio, dalla benzina al gasolio, dipende dalla loro volatilità.

Alcuni oli greggi e combustibili pesanti contengono una percentuale apprezzabile di costituenti di natura bituminosa e polimerica che sono poco solubili nella miscela di solventi (6.6); il loro recupero è di conseguenza incompleto.

L'impossibilità, in molti casi, di conoscere "a priori" la composizione della miscela oleosa presente nel campione e, quindi, la necessità di utilizzare come soluzione di riferimento una miscela diversa da quella del campione costituisce la più rilevante causa di errori nella determinazione in oggetto.

Un graduale aumento di peso osservato durante la fase di evaporazione dell'estratto, se si opera in assenza di essiccatore, rappresenta una tipica causa di errore; l'incompleta eliminazione dell'acqua dall'estratto organico comporta, dopo essiccamento, la comparsa di cristalli di sodio solfato e quindi una sovrastima di sostanze oleose nel campione. Tale interferenza può essere rimossa sciogliendo nuovamente l'estratto nel solvente di estrazione e procedendo all'allontanamento del solfato di sodio per filtrazione.

Per ridurre il rischio di contaminazione dei campioni è consigliato l'uso di attrezzature in vetro con giunti normalizzati e smerigliati. È da escludere l'uso di lubrificanti.

La vetreria da laboratorio impiegata deve essere riservata specificatamente per questo tipo di indagine. Va lavata con detersivo, sciacquata con acqua deionizzata, asciugata in stufa e trattata, prima dell'uso, con la miscela di solventi (6.6).

4. Campionamento e conservazione del campione

Una particolare attenzione richiede la tecnica di prelievo di campioni di acqua, a causa del fatto che le sostanze oleose si presentano nei corpi idrici sotto forma di film superficiale o di goccioline.

Dal punto di vista pratico un prelievo omogeneo può essere effettuato:

- con la stessa bottiglia di raccolta nel caso di scarichi effettuati per caduta da apposite tubazioni;

- con l'uso di un dispositivo capace di raccogliere una sezione trasversale completa dello scarico.

I campioni vanno raccolti in bottiglie di vetro pulite, a collo e tappo smerigliato, lavate con la miscela di solventi (6.6) e asciugate prima dell'uso. Le bottiglie di raccolta non vanno riempite fino all'orlo, per evitare, durante il loro trasporto, perdite di composti oleosi stratificati in superficie. Allo scopo di inibire eventuali attività batteriche, il campione prelevato va subito portato a pH=2 con acido cloridrico diluito 1:1 e analizzato il più presto possibile, conservandolo, nel frattempo, a 4°C.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

5.2 *Bottiglia in vetro da campionamento* a collo largo, da 200-3000 mL circa, con tappo smerigliato oppure con tappo a vite con guarnizione di tenuta in teflon.

5.3 *Imbuti separatori da 500 mL a 3000 mL*, muniti di rubinetto in teflon. In alternativa è possibile utilizzare bottiglie di campionamento in vetro dello stesso volume con chiusura a vite, tappo con guarnizione di tenuta in teflon, dotate di rubinetto in teflon per consentire l'estrazione degli analiti direttamente nella bottiglia.

5.4 *Pallone da distillazione* codato a fondo piatto da 300 mL con raccordo per l'inserimento del condensatore Liebig (5.8).

5.5 *Capsule di porcellana o beaker* di vetro (di peso non superiore a 70 g) da circa 100 mL.

5.6 *Bagno termostatico ad acqua*

5.7 *Stufa a convezione naturale*

5.8 *Condensatore tipo Liebig*, lungo 300 mm, con giunto sferico normalizzato 24/29 con raccordo al recipiente di raccolta del distillato (in alternativa qualunque dispositivo utilizzabile per la raccolta del solvente).

5.9 *Imbuto filtrante a setto poroso*

6. Reattivi

6.1 *Acido cloridrico* ($d=1,19$), diluito 1:1 (v/v).

6.2 *n-Esano*

6.3 *Metil-tert-butiletere*

6.4 *Cloruro di sodio*, solido.

6.5 *Sodio solfato anidro* (Na_2SO_4) per analisi, trattato a 400°C per 4 ore; conservare in essiccatore.

6.6 *Miscela di solventi*

Preparare la miscela ponendo in un recipiente 80 volumi di n-esano (6.2) e 20 volumi di metil-tert-butiletere (6.3).

7. Procedimento

7.1 Estrazione

Il procedimento descritto è relativo a volumi di campione di 2 L circa. È consigliabile in tal caso usare una bottiglia marcata al segno di 2 litri. Trasferire quantitativamente il campione in un imbuto separatore da 3000 mL, procedere all'aggiunta di 5 mL/L di HCl 1:1 (6.1), se non è stata già effettuata all'atto del campionamento. Controllare che il pH sia ≤ 2 , in caso contrario aggiungere altro HCl 1:1. Aggiungere 10 g di cloruro di sodio (6.4) e versare nell'imbuto 100 mL della miscela di solventi (6.6) dopo aver lavato con la stessa la bottiglia che aveva contenuto il campione, computando la quantità eventualmente già impiegata per il lavaggio del dispositivo di campionamento. Agitare vigorosamente l'imbuto separatore per 2 minuti oppure per 20 minuti mediante agitazione meccanica. Dopo qualche secondo di agitazione è opportuno aprire il rubinetto allo scopo di ridurre la pressione. Imprimere un movimento rotatorio al liquido contenuto nell'imbuto separatore per favorire la separazione delle due fasi. Dopo aver separato le due fasi, filtrare l'estratto organico attraverso un imbuto filtrante contenente circa 3 g di solfato di sodio anidro (6.5) uniformemente distribuito sul setto e raccogliere l'estratto organico nel recipiente 5.4. L'utilizzo di un filtro GF/F, da porre sul setto dell'imbuto filtrante, consente di minimizzare il passaggio di sali nell'estratto organico e di evitare una sovrastima del contenuto di sostanze oleose nell'estratto.

Versare altri 100 mL di miscela (6.6), estrarre nuovamente come descritto sopra e raccogliere l'estratto organico nel pallone di distillazione (5.4). Lavare il solfato di sodio con 2 aliquote di miscela (6.6) (15 mL per volta) e raccogliere l'eluato nel recipiente 5.4.

7.2 Evaporazione e pesata

Distillare cautamente l'estratto impiegando l'apparecchiatura di distillazione di cui ai punti 5.4 e 5.8, su bagno termostatico, concentrando fino a circa 10 mL.

Versare la soluzione residua nel recipiente 5.5 (*) (pulito, condizionato per 60 minuti in stufa a 55°C, lasciato raffreddare per 30 minuti in essiccatore e pesato), risciacquare poi il pallone con una modesta quantità di miscela (6.6) e recuperare i lavaggi nel medesimo recipiente 5.5. Portare quasi a secchezza il contenuto del recipiente 5.5, esponendolo ai vapori del bagno termostatico mantenuto a circa 80°C.

Tenere quindi il recipiente 5.5 in stufa a 55°C per 60 minuti.

Lasciare raffreddare in essiccatore per 30 minuti e quindi pesare.

8. Calcoli

Calcolare la concentrazione delle sostanze oleose totali, espressa in mg/L, nel modo seguente:

$$C = \frac{A-B}{V}$$

dove:

C = concentrazione di sostanze oleose totali (mg/L);

A = peso (mg) del residuo nel recipiente (5.5), estratto dal campione;

B = peso (mg) dell'eventuale residuo rimasto dopo una prova in bianco, condotta su 230 mL di miscela (6.6), procedimento descritto al Paragrafo (7.2);

V = volume (L) di campione.

(*) A causa della notevole delicatezza dell'analisi i beaker o le capsule non devono essere mai toccati direttamente con le mani, ma soltanto con apposite pinze di acciaio inossidabile e devono essere appoggiate su superfici perfettamente pulite (ad esempio vetri da orologio).

9. Qualità del dato

Prove effettuate da quattro laboratori su soluzioni di acqua deionizzata contenenti 20 mg/L di sostanze oleose hanno fornito uno scarto tipo di 2,59 mg/L per il singolo operatore e 3,67 mg/L come riproducibilità.

METODO A2 – Idrocarburi totali

1. Principio del metodo

Il campione in esame viene acidificato ed estratto con una miscela di n-esano (80%) e metil-tert-butiletere (20%). L'estratto viene percolato attraverso una colonna riempita di gel di silice, per eliminare le sostanze polari eventualmente presenti, raccolto in un recipiente ed evaporato. Il residuo viene determinato per via gravimetrica.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali, di scarico e di mare per concentrazioni in idrocarburi totali superiori a 10 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Durante il procedimento di estrazione le sostanze si ripartiscono tra le due fasi in ragione del proprio coefficiente di ripartizione tra la miscela di solventi (6.6) e l'acqua, da cui può derivare una sottostima. La doppia estrazione serve a migliorare il recupero.

La rimozione del solvente comporta la perdita per evaporazione delle sostanze più leggere; la perdita che subiscono in questa operazione i distillati del petrolio, dalla benzina al gasolio, dipende dalla loro volatilità.

Alcuni oli greggi e combustibili pesanti contengono una percentuale apprezzabile di costituenti di natura bituminosa e polimerica che sono poco solubili nella miscela di solventi (6.6); il loro recupero è di conseguenza incompleto.

L'impossibilità, in molti casi, di conoscere "a priori" la composizione della miscela oleosa presente nel campione e, quindi, la necessità di utilizzare come soluzione di riferimento una miscela diversa da quella del campione costituisce la più rilevante causa di errori nella determinazione in oggetto.

Un graduale aumento di peso osservato durante la fase di evaporazione dell'estratto, se si opera in assenza di essiccatore, rappresenta una tipica causa di errore; l'incompleta eliminazione dell'acqua dall'estratto organico comporta, dopo essiccamento, la comparsa di cristalli di sodio solfato e quindi una sovrastima di sostanze oleose nel campione. Tale interferenza può essere rimossa sciogliendo nuovamente l'estratto nel solvente di estrazione e procedendo all'allontanamento del solfato di sodio per filtrazione.

Per ridurre il rischio di contaminazione dei campioni è consigliato l'uso di attrezzature in vetro con giunti normalizzati e smerigliati. È da escludere l'uso di lubrificanti.

La vetreria da laboratorio impiegata deve essere riservata specificatamente per questo tipo di indagine. Va lavata con detersivo, sciacquata con acqua deionizzata, asciugata in stufa e trattata, prima dell'uso, con la miscela di solventi (6.6).

4. Campionamento e conservazione del campione

Una particolare attenzione richiede la tecnica di prelievo di campioni di acqua, a causa del fatto che le sostanze oleose si presentano nei corpi idrici sotto forma di film superficiale o di goccioline.

Dal punto di vista pratico un prelievo omogeneo può essere effettuato:

- con la stessa bottiglia di raccolta nel caso di scarichi effettuati per caduta da apposite tubazioni;
- con l'uso di un dispositivo capace di raccogliere una sezione trasversale completa dello scarico.

I campioni vanno raccolti in bottiglie di vetro pulite, a collo e tappo smerigliato, lavate con la miscela di solventi (6.6) e asciugate prima dell'uso. Le bottiglie di raccolta non vanno riempite fino all'orlo, per evitare, durante il loro trasporto, perdite di idrocarburi stratificati in superficie.

Allo scopo di inibire eventuali attività batteriche, il campione prelevato va subito portato a pH=2 con acido cloridrico diluito 1:1 e analizzato il più presto possibile, conservandolo, nel frattempo, a 4°C.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

5.2 *Bottiglia in vetro da campionamento* a collo largo, da 200-3000 mL circa, con tappo smerigliato oppure con tappo a vite con guarnizione di tenuta in teflon.

5.3 *Imbuti separatori da 3000 mL*, muniti di rubinetto in teflon. In alternativa è possibile utilizzare bottiglie di campionamento in vetro dello stesso volume con chiusura a vite, tappo con guarnizione di tenuta in teflon, dotate di rubinetto in teflon per consentire l'estrazione degli analiti direttamente nella bottiglia.

5.4 *Pallone da distillazione* codato a fondo piatto da 300 mL con adatto raccordo per l'inserimento del condensatore Liebig (5.8).

5.5 *Capsule di porcellana o beaker* di vetro (di peso non superiore a 70 g) da circa 100 mL.

5.6 *Bagno termostatico ad acqua*

5.7 *Stufa a convezione naturale*

5.8 *Condensatore tipo Liebig*, lungo 300 mm, con giunto sferico normalizzato 24/29 con opportuno raccordo al recipiente di raccolta del distillato (in alternativa qualunque dispositivo utilizzabile per la raccolta del solvente).

5.9 *Colonna di percolazione in vetro*, d.i. 10 mm, con rubinetto in teflon.

6. Reattivi

6.1 *Acido cloridrico (d=1,19)*, diluito 1:1 (v/v).

6.2 *n-Esano*

6.3 *Metil-tert-butiletere*

6.4 *Cloruro di sodio, solido.*

6.5 *Sodio solfato anidro (Na₂SO₄) p.a., trattato a 400°C per 4 ore; conservare in essiccatore.*

6.6 *Miscela di solventi*

Preparare la miscela ponendo in un recipiente 80 volumi di n-esano (6.2) e 20 volumi di metil-tert-butiletere (6.3).

6.7 *Gel di silice 70-230 mesh per cromatografia su colonna.*

7. Procedimento

7.1 Estrazione

Il procedimento descritto è relativo a volumi di campione pari a 2 litri circa. È consigliabile in tal caso usare una bottiglia marcata al segno di 2 litri. Trasferire quantitativamente il campione in un imbuto separatore da 3000 mL, procedere all'aggiunta di 5 mL/L di HCl 1:1 (6.1), se non è stata già effettuata all'atto del campionamento. Controllare che il pH sia ≤2, in caso contrario aggiungere altro HCl 1:1. Aggiungere 10 g di cloruro di sodio (6.4) e versare nell'imbuto 100 mL della miscela di solventi (6.6) dopo aver lavato con la stessa la bottiglia che aveva contenuto il campione, computando la quantità eventualmente già impiegata per il lavaggio del dispositivo di campionamento. Agitare vigorosamente l'imbuto separatore per 2 minuti oppure per 20 minuti mediante agitazione meccanica. Dopo qualche secondo di agitazione è opportuno aprire il rubinetto allo scopo di ridurre la pressione. Impri- mere un movimento rotatorio al liquido contenuto nell'imbuto separatore per favorire la separazione delle due fasi. Lasciar separare le due fasi e far percolare la fase organica attraverso una colonnina di vetro, munita di rubinetto in teflon e riempita con uno strato (5 cm di altezza) di gel di silice (6.6) seguito da uno strato di 3 g di Na₂SO₄ (6.5). La fase organica, dopo aver attraversato la colonna, viene raccolta nel pallone di distillazione 5.4.

Ripetere l'estrazione e la percolazione su gel di silice con altri 100 mL di miscela (6.6), quindi la fase organica viene raccolta nel pallone di distillazione 5.4.

Lavare due volte la colonnina, facendo passare 15 mL alla volta di miscela (6.6) e raccogliere la fase organica nel recipiente 5.4.

7.2 Evaporazione e pesata

Distillare cautamente l'estratto impiegando l'apparecchiatura di distillazione di cui ai Paragrafi (5.4) e (5.8), su bagno termostatico, concentrando fino a circa 10 mL.

Versare la soluzione residua nel recipiente 5.5 (*) (pulito, condizionato per 60 minuti in stufa a 55°C, lasciato raffreddare per 30 minuti in essiccatore e pesato), risciacquare poi il pallone con modesta quantità di miscela (6.6) e recuperare i lavaggi nel medesimo recipiente 5.5. Portare quasi a secchezza il contenuto del recipiente 5.5, esponendolo ai vapori del bagno termostatico mantenuto a circa 80°C.

Tenere quindi il recipiente 5.5 in stufa a 55°C per 60 minuti.

Lasciare raffreddare in essiccatore per 30 minuti e quindi pesare.

(*) A causa della notevole delicatezza dell'analisi i beaker o le capsule non devono essere mai toccati direttamente con le mani, ma soltanto con apposite pinze di acciaio inossidabile e devono essere appoggiate su superfici perfettamente pulite (ad esempio vetri da orologio).

8. Calcoli

Calcolare la concentrazione degli idrocarburi totali, espressa in mg/L, nel modo seguente:

$$C = \frac{A-B}{V}$$

dove:

C = concentrazione (mg/L) di idrocarburi totali;

A = peso (mg) del residuo nel recipiente (5.5), estratto dal campione;

B = peso (mg) dell'eventuale residuo rimasto dopo una prova in bianco, condotta su 230 mL di miscela (6.6), procedimento descritto al Paragrafo (7.2);

V = volume (L) di campione.

9. Qualità del dato

Prove effettuate da quattro laboratori su soluzioni di acqua deionizzata contenenti 20 mg/L di idrocarburi hanno fornito uno scarto tipo di 3,09 mg/L per il singolo operatore e 4,07 mg/L come riproducibilità.

METODO B – Determinazione mediante spettrofotometria infrarossa

METODO B1 – Sostanze oleose totali

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla determinazione delle sostanze oleose totali mediante spettrofotometria di assorbimento all'infrarosso (IR). Il campione di acqua, preventivamente acidificato, viene estratto con 1,1,2-triclorotrifluoroetano. Dalla misura dell'area nella regione compresa tra 3015 e 2800 cm^{-1} si ricava la concentrazione delle sostanze oleose totali mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni di riferimento (esadecano, iso-ottano) a concentrazioni note comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque di scarico, superficiali e di mare per concentrazioni di sostanze oleose totali superiori a 0,05 mg/L. Tale limite può essere ulteriormente abbassato a 0,01 mg/L se si dispone di un'apparecchiatura FT-IR, e se si utilizzano celle di più elevato cammino ottico (>1 cm).

3. Interferenze e cause di errore

Durante il procedimento di estrazione le sostanze si ripartiscono tra le due fasi in ragione del proprio coefficiente di ripartizione tra 1,1,2-triclorotrifluoroetano e acqua. La doppia estrazione serve a migliorare il recupero.

Alcuni oli greggi e combustibili pesanti contengono una percentuale apprezzabile di costituenti di natura bituminosa e polimerica che sono poco solubili in 1,1,2-triclorotrifluoroetano; il loro recupero è di conseguenza incompleto.

L'impossibilità, in molti casi, di conoscere "a priori" la composizione della miscela oleosa pre-

sente nel campione e, quindi, la necessità di utilizzare come soluzione di riferimento una miscela diversa da quella del campione costituisce la più rilevante causa di errori nella determinazione in oggetto.

Per ridurre il rischio di contaminazione dei campioni è consigliato l'uso di attrezzature in vetro con giunti normalizzati e smerigliati. È da escludere l'uso di lubrificanti.

La vetreria da laboratorio impiegata deve essere riservata specificatamente per questo tipo di indagine. Va lavata con detersivo, sciacquata con acqua deionizzata, asciugata in stufa e trattata, prima dell'uso, con 1,1,2-triclorotrifluoroetano.

4. Campionamento e conservazione del campione

Una particolare attenzione richiede la tecnica di prelievo di campioni di acqua, a causa del fatto che le sostanze oleose si presentano nei corpi idrici sotto forma di film superficiale o di goccioline.

Dal punto di vista pratico un prelievo omogeneo può essere effettuato:

- con la stessa bottiglia di raccolta nel caso di scarichi effettuati per caduta da apposite tubazioni;
- con l'uso di un dispositivo capace di raccogliere una sezione trasversale completa dello scarico.

I campioni vanno raccolti in bottiglie di vetro pulite, a collo e tappo smerigliato, lavate con 1,1,2-triclorotrifluoroetano e asciugate prima dell'uso. Le bottiglie di raccolta non vanno riempite fino all'orlo, per evitare, durante il loro trasporto, perdite di composti oleosi stratificati in superficie. Allo scopo di inibire eventuali attività batteriche, il campione prelevato va subito portato a pH=2 con acido cloridrico diluito 1:1 (v/v) e analizzato il più presto possibile, conservandolo, nel frattempo, a 4°C.

5. Apparecchiature

5.1 *Normale attrezzatura di laboratorio*

5.2 *Bottiglia di campionamento in vetro a collo largo, da 500-3000 mL circa, con tappo smerigliato oppure con tappo a vite con guarnizione in teflon.*

5.3 *Imbuti separatori di volume adeguato, muniti di rubinetto e tappo in teflon. In alternativa è possibile utilizzare bottiglie di campionamento in vetro con chiusura a vite, tappo con guarnizione di tenuta in teflon.*

5.4 *Spettrofotometro FT-IR o IR, doppio raggio, munito di celle in quarzo con cammino ottico di 1 cm e di 4 cm.*

5.5 *Imbuto filtrante a setto poroso, capacità 50 mL.*

5.6 *Bilancia analitica*

5.7 *Bilancia tecnica*

6. Reattivi

6.1 *Acido cloridrico (d=1,19), diluito 1:1 (v/v).*

6.2 *1,1,2-triclorotrifluoroetano "per Spettroscopia".*

6.3 *n*-Esadecano per analisi

6.4 Iso-ottano per analisi

6.5 Sodio solfato anidro (Na_2SO_4) p.a., trattato a 400°C per 4 ore; conservare in essiccatore.

6.6 Soluzione di riferimento di idrocarburi

Preparare la soluzione di riferimento costituita da *n*-esadecano (50% in volume) e iso-ottano (50% in volume) trasferendo 10 mL di *n*-esadecano e 10 mL di iso-ottano in un flacone da 25 mL. Tappare con ghiera di alluminio e sottotappo in teflon. Tale miscela conservata a 4°C è stabile sei mesi.

6.7 Soluzione concentrata di idrocarburi (1 mg/mL)

Pesare $100\text{ mg} \pm 1\text{ mg}$ di miscela (6.6) in matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con 1,1,2-triclorotrifluoroetano. La soluzione conservata a 4°C è stabile tre mesi.

6.8 Soluzioni diluite

Prelevare volumi della soluzione concentrata di idrocarburi (6.7) esattamente noti (esempio 0,5 mL; 1 mL; 5 mL) e portare a volume in matraccio tarato da 50 mL. In un altro matraccio da 50 mL, che fungerà da bianco, aggiungere 50 mL di 1,1,2-triclorotrifluoroetano. Tali soluzioni vanno preparate giornalmente.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione delle condizioni strumentali

Lo spettrofotometro IR (o FT-IR) rimane normalmente acceso anche nel caso di prolungata inattività. Prima di avviare il ciclo di misure, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli di riferimento.

7.2 Taratura

Quando la natura dell'inquinante è nota, è auspicabile impiegare per la taratura lo stesso composto, preparando soluzione diluite in 1,1,2-triclorotrifluoroetano. Tuttavia, poichè nella maggior parte dei casi la natura della miscela di idrocarburi presente nel campione non è nota, si ricorre ad una miscela di riferimento. Per molti anni si è utilizzata come soluzione di riferimento una miscela di esadecano (37,5%), iso-ottano (37,5%) e benzene (25%). Tuttavia, la maggiore attenzione prestata in questi ultimi anni alle problematiche concernenti la salute degli operatori addetti al controllo, in particolar modo in presenza di sostanze, come il benzene, di accertata cancerogenicità, suggerisce di eliminare, in accordo con quanto previsto dal metodo ASTM, il benzene dalla suddetta miscela. Tale eliminazione ha, peraltro, scarsa rilevanza sul piano della qualità del dato ottenuto in quanto i diversi protocolli standardizzati prevedono la misura dell'assorbanza in una regione dello spettro IR in cui il benzene non fornisce alcun contributo (come altezza di picco a 2930 cm^{-1} o come area integrata nell'intervallo $3015\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$).

Alla luce delle considerazioni esposte si suggerisce l'impiego della soluzione di riferimento (6.6). Registrare lo spettro IR delle soluzioni diluite (6.8) nella regione compresa tra 3200 cm^{-1} e 2700 cm^{-1} , utilizzando il 1,1,2-triclorotrifluoroetano (6.2) come riferimento. Misurare l'integrale dell'area sottesa dai picchi compresi nella regione $3015\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$.

7.3 *Trattamento del campione*

7.3.1 Estrazione

Trasferire un quantitativo noto del campione in esame, compreso tra 0,5 L e 2,0 L, in adatto imbuto separatore e procedere all'aggiunta di 5 mL di HCl 1:1 (6.1), se non è stata già effettuata all'atto del campionamento. Controllare che il pH sia ≤ 2 , in caso contrario aggiungere altro HCl 1:1.

Aggiungere, operando sotto cappa, 20 mL di 1,1,2-triclorotrifluoroetano con cui si è lavata la bottiglia di raccolta del campione e, qualora sia stato usato, il contenitore in vetro dell'apposito dispositivo di campionamento. Agitare vigorosamente l'imbuto separatore per 2 minuti oppure per 20 minuti mediante agitazione meccanica. Lasciare separare le due fasi, filtrare l'estratto organico attraverso un imbuto filtrante contenente circa 3 g di solfato di sodio anidro (6.5) uniformemente distribuito sul setto e raccogliere l'estratto organico in un pallone tarato da 50 mL. Ripetere l'estrazione con altri 20 mL di 1,1,2-triclorotrifluoroetano e unire l'estratto a quello precedente. Portare a volume a 50 mL.

7.4 *Analisi*

Effettuare uno spettro preliminare per rendersi conto dell'ordine di grandezza del valore di area da misurare.

Registrazione lo spettro IR della soluzione ottenuta dall'estrazione del campione seguendo le modalità già indicate per le soluzioni diluite (6.8).

Misurare l'area sottesa dai picchi compresi nella regione 3015-2800 cm^{-1} .

8. **Calcoli**

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le quantità (in mg) delle soluzioni taratura in ascissa e le unità di area corrispondenti in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se la deviazione standard della retta stimata è inferiore al 5%.

La concentrazione di sostanze oleose totali viene ricavata dalla seguente formula:

$$C = \frac{A \cdot f}{V}$$

dove:

C = concentrazione (mg/L) di sostanze oleose totali;

A = quantità (mg) ricavata utilizzando l'equazione della retta di regressione;

f = fattore di diluizione (eventuale) dell'estratto;

V = volume (L) di campione.

9. **Qualità del dato**

Prove effettuate da cinque laboratori su campioni di acque di scarico contenenti 2 mg/L di sostanze oleose hanno fornito uno scarto tipo pari a 0,21 mg/L per il singolo operatore e 0,22 mg/L come riproducibilità.

METODO B2 - Idrocarburi totali

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla determinazione degli idrocarburi totali mediante spettrofotometria di assorbimento all'infrarosso (IR). Il campione di acqua, preventivamente acidificato, viene estratto con 1,1,2-triclorotrifluoroetano; la fase organica viene fatta percolare attraverso una colonna di gel di silice per eliminare le sostanze polari coestratte. Dalla misura dell'area nella regione compresa tra 3015 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} si ricava la concentrazione degli idrocarburi totali mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni di riferimento (esadecano, iso-ottano) a concentrazioni note comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque di scarico, superficiali e di mare per concentrazioni di idrocarburi totali superiori a 0,05 mg/L. Tale limite può essere ulteriormente abbassato a 0,01 mg/L se si dispone di un'apparecchiatura FT-IR e se si utilizzano celle di più elevato cammino ottico (>1 cm).

3 Interferenze e cause di errore

Durante il procedimento di estrazione gli idrocarburi si ripartiscono tra le due fasi in ragione del proprio coefficiente di ripartizione tra 1,1,2-triclorotrifluoroetano e acqua. La doppia estrazione serve a migliorare il recupero.

Alcuni oli greggi e combustibili pesanti contengono una percentuale apprezzabile di costituenti di natura bituminosa e polimerica che sono poco solubili in 1,1,2-triclorotrifluoroetano; il loro recupero è di conseguenza incompleto.

L'impossibilità, in molti casi, di conoscere "a priori" la composizione della miscela oleosa presente nel campione e, quindi, la necessità di utilizzare come soluzione di riferimento una miscela diversa da quella del campione costituisce la più rilevante causa di errori nella determinazione in oggetto.

Per ridurre il rischio di contaminazione dei campioni è consigliato l'uso di attrezzature in vetro con giunti normalizzati e smerigliati. È da escludere l'uso di lubrificanti.

La vetreria da laboratorio impiegata deve essere riservata specificatamente per questo tipo di indagine. Va lavata con detersivo, sciacquata con acqua deionizzata, asciugata in stufa e trattata, prima dell'uso, con 1,1,2-triclorotrifluoroetano.

La purificazione degli estratti su colonne di gel di silice può essere causa di errori sia positivi che negativi dovuti, nel primo caso, al rilascio di sostanze organiche adsorbite sul substrato e, nel secondo caso, ad incompleta eluizione degli idrocarburi. Per evitare questi inconvenienti si deve controllare la purezza del gel di silice e verificare il recupero degli idrocarburi eluiti dalla colonna.

4. Campionamento e conservazione del campione

Una particolare attenzione richiede la tecnica di prelievo di campioni di acqua, a causa del fatto che le sostanze oleose si presentano nei corpi idrici sotto forma di film superficiale o di goccioline. Dal punto di vista pratico un prelievo omogeneo può essere effettuato:

- con la stessa bottiglia di raccolta nel caso di scarichi effettuati per caduta da apposite tubazioni;
- con l'uso di un dispositivo capace di raccogliere una sezione trasversale completa dello scarico.

I campioni vanno raccolti in bottiglie di vetro pulite, a collo e tappo smerigliato, lavate con 1,1,2-triclorotrifluoroetano e asciugate prima dell'uso. Le bottiglie di raccolta non vanno riempite fino all'orlo, per evitare, durante il loro trasporto, perdite di idrocarburi stratificati in superficie.

Allo scopo di inibire eventuali attività batteriche, il campione prelevato va subito portato a pH=2 con acido cloridrico diluito 1:1 e analizzato il più presto possibile, conservandolo, nel frattempo, a 4°C.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

5.2 *Bottiglia di campionamento in vetro* a collo largo, da 500-3000 mL circa, con tappo smerigliato oppure con tappo a vite con guarnizione in teflon.

5.3 *Imbuti separatori* di volume adeguato, muniti di rubinetto e tappo in teflon. In alternativa è possibile utilizzare bottiglie di campionamento in vetro dello stesso volume con chiusura a vite, tappo con guarnizione di tenuta in teflon.

5.4 *Spettrofotometro FT-IR o IR*, doppio raggio, munito di celle in quarzo con cammino ottico di 1 cm e di 4 cm.

5.5 *Colonnine di percolazione in vetro*, d.i. 10 mm, con rubinetto in teflon.

5.6 *Bilancia analitica*

5.7 *Bilancia tecnica*

6. Reattivi

6.1 *Acido cloridrico* ($d=1,19$), diluito 1:1 (v/v).

6.2 *1,1,2-triclorotrifluoroetano* "per Spettroscopia".

6.3 *n-Esadecano per analisi*

6.4 *Iso-ottano per analisi*

6.5 *Sodio solfato anidro* (Na_2SO_4) *per analisi*, trattato a 400°C per 4 ore; conservare in essiccatore.

6.6 *Gel di silice* 70-230 mesh per cromatografia su colonna.

6.7 *Soluzione di riferimento di idrocarburi*

Preparare la soluzione di riferimento costituita da n-esadecano (50% in volume) e iso-ottano (50% in volume) trasferendo 10 mL di n-esadecano e 10 mL di iso-ottano in un flacone da 25 mL. Tappare con ghiera di alluminio e sottotappo in teflon. Tale miscela conservata a 4°C è stabile sei mesi.

6.8 *Soluzione concentrata di idrocarburi* (1 mg/mL)

Pesare 100 mg \pm 1 mg di miscela (6.7) in matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con 1,1,2-triclorotrifluoroetano. La soluzione conservata a 4°C è stabile tre mesi.

6.9 Soluzioni diluite

Prelevare volumi della soluzione concentrata di idrocarburi (6.8) esattamente noti (esempio 0,5 mL; 1 mL; 5 mL) e portare a volume in matraccio tarato da 50 mL. In un altro matraccio da 50 mL, che fungerà da bianco, aggiungere 50 mL di 1,1,2-triclorofluoroetano. Tali soluzioni vanno preparate giornalmente.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione delle condizioni strumentali

Lo spettrofotometro IR (o FT-IR) rimane normalmente acceso anche nel caso di prolungata inattività. Prima di avviare il ciclo di misure, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli di riferimento.

7.2 Taratura

Quando la natura dell'inquinante è nota, è auspicabile impiegare per la taratura lo stesso composto, preparando soluzioni diluite in 1,1,2-triclorotrifluoroetano. Tuttavia, poichè nella maggior parte dei casi la natura della miscela di idrocarburi presente nel campione non è nota, si ricorre ad una miscela di riferimento. Per molti anni si è utilizzata come soluzione di riferimento una miscela di esadecano (37,5%), iso-ottano (37,5%) e benzene (25%). Tuttavia, la maggiore attenzione prestata in questi ultimi anni alle problematiche concernenti la salute degli operatori addetti al controllo, in particolar modo in presenza di sostanze, come il benzene, di accertata cancerogenicità, suggerisce di eliminare, in accordo con quanto previsto dal metodo ASTM, il benzene dalla suddetta miscela. Tale eliminazione ha, peraltro, scarsa rilevanza sul piano della qualità del dato ottenuto in quanto i diversi protocolli di riferimento prevedono la misura dell'assorbanza in una regione dello spettro IR in cui il benzene non fornisce alcun contributo (come altezza di picco a 2930 cm^{-1} o come area integrata nell'intervallo 3015-2800 cm^{-1}).

Alla luce delle considerazioni esposte si suggerisce l'impiego della soluzione di riferimento (6.7).

Registrare lo spettro IR delle soluzioni diluite (6.9) nella regione compresa tra 3200 cm^{-1} e 2700 cm^{-1} utilizzando il 1,1,2-triclorotrifluoroetano (6.2) come riferimento. Misurare l'integrale dell'area sottesa dai picchi compresi nella regione 3015-2800 cm^{-1} .

7.3 Trattamento del campione

7.3.1 Estrazione

Trasferire un quantitativo noto del campione in esame, compreso tra 0,5 L e 2,0 L, in adatto imbuto separatore e procedere all'aggiunta di 5 mL di HCl 1:1 (6.1), se non è stata già effettuata all'atto del campionamento. Controllare che il pH sia ≤ 2 , in caso contrario aggiungere altro HCl 1:1.

Aggiungere, operando sotto cappa, 20 mL di 1,1,2-triclorotrifluoroetano con cui si è lavata la bottiglia di raccolta del campione e, qualora sia stato usato, il contenitore in vetro dell'apposito dispositivo di campionamento. Agitare vigorosamente l'imbuto separatore per 2 minuti oppure per 20 minuti mediante agitazione meccanica. Lasciare separare le due fasi e far percolare la fase organica attraverso una colonnina di vetro, munita di rubinetto in teflon e riempita con 0,5 g di gel di silice (6.6) e 0,3 g di Na_2SO_4 (6.5) disposti su strati sovrapposti. La colonnina va preventivamente lavata con 1,1,2-triclorotrifluoroetano e l'eluato analizzato all'IR per controllare l'assenza di bande idrocarburiche nell'intervallo spettrale di interesse analitico. Generalmente sono sufficienti per il lavaggio 15 mL. Raccogliere il percolato in un matraccio tarato da 50 mL, avendo cura di scartare i primi 2 mL circa. Ripetere l'estrazione

con altri 20 mL di 1,1,2-triclorotrifluoroetano; l'estratto, assieme alle tracce di emulsione eventualmente presenti, viene percolato attraverso la colonnina e raccolto nello stesso matraccio precedente. Portare a volume a 50 mL.

7.4 *Analisi*

Effettuare uno spettro preliminare per rendersi conto dell'ordine di grandezza del valore di area da misurare.

Registrare lo spettro IR della soluzione ottenuta dall'estrazione del campione seguendo le modalità già indicate per le soluzioni diluite (6.9).

Misurare l'area sottesa dai picchi compresi nella regione 3015-2800 cm⁻¹.

8. **Calcoli**

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le quantità (in mg) delle soluzioni diluite (6.9) in ascissa e le unità di area corrispondenti in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

La concentrazione di idrocarburi totali viene ricavata dalla seguente formula:

$$C = \frac{A \cdot f}{V}$$

dove:

C = concentrazione (mg/L) di idrocarburi totali;

A = quantità (mg) ricavata utilizzando l'equazione della retta di regressione;

f = fattore di diluizione (eventuale) dell'estratto;

V = volume (L) di campione.

9. **Qualità del dato**

Su campioni di acqua di scarico il valor medio dei recuperi di aggiunte di soluzioni di riferimento di idrocarburi nell'intervallo di concentrazione compreso tra 1 mg/L e 5 mg/L è risultato del 98%.

Una serie di misure (n=5) effettuate su campioni di acque naturali a concentrazione di 0,30 mg/L ha fornito un coefficiente di variazione del 7%.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard Methods for the examination of water and wastewater", XX Ed., (Washington, APHA).

ASTM (1996): "Standard test method for oil and grease and petroleum hydrocarbons in water", D 3921, 355-360, (Philadelphia).

CARLBERG S.R. & SKARSTEDT C.B. (1972): "Determination of small amounts of non-polar hydrocarbons (oil) in sea water", *J. Cons. Int. Explor. Mer*, **34**, 506-515.

EPA (1979): "Manual of methods for chemical analysis of water and wastes", Cincinnati, Environmental Research Center.

EPA (1994): "Total recoverable petroleum hydrocarbons by infrared spectrophotometry", Method 418.1, Cincinnati.

IRSA (1984): "Oli minerali. Determinazione spettrofotometrica IR", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **59**, 402.2.

SIMARD R.G., RASEGAWA I., BANDARUK W. & HEADINGTON C.E. (1951): "Infrared spectrophotometric determination of oil and phenols in water", *Anal. Chem.*, **23**, 1384-1387.

UNICHIM (1995a): "Manuale 177/7. Linee guida per la taratura della strumentazione analitica - Spettrometria a dispersione nella regione dell'infrarosso".

UNICHIM (1995b): "Manuale 177/8. Linee guida per la taratura della strumentazione analitica - Spettrometria a trasformata di Fourier nella regione dell'infrarosso".

ISO 9377-2: (2000): "Water quality - Determination of hydrocarbon oil index - Part 2. Method using solvent extraction and gas chromatography".

5170. Tensioattivi anionici

Introduzione

I tensioattivi anionici sono costituenti fondamentali dei formulati impiegati nella detergenza domestica ed industriale. La loro presenza in acque superficiali e sotterranee è sempre indice di inquinamento antropico.

Con il termine di tensioattivi anionici si intende l'insieme delle molecole organiche caratterizzate dalla presenza di una componente idrofobica (catena idrocarburica lineare o ramificata) e di una idrofila carica negativamente (anione solfonato o solfato).

1. Principio del metodo

I tensioattivi anionici formano con il blu di metilene (colorante cationico) un sale di colore blu che viene estratto quantitativamente in cloroformio. L'assorbanza della fase cloroformica è proporzionale alla concentrazione del tensioattivo anionico e viene misurata, per via spettrofotometrica, alla lunghezza d'onda di 650 nm.

2. Campo di applicazione

Il metodo determina globalmente i tensioattivi anionici solfonati e solfatati (MBAS)(*) presenti in acque di scarico urbane ed industriali e in acque superficiali e sotterranee.

Il metodo è applicabile nell'intervallo di concentrazione 0,025-100 mg/L di tensioattivi espressi come MBAS. L'utilizzo di celle con cammino ottico di 5 cm consente di rilevare concentrazioni fino a 0,005 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Interferenze positive vengono date da sostanze organiche che danno luogo a sali con il blu di metilene, estraibili in cloroformio (solfati, solfonati e carbossilati organici, ecc.), o da sostanze inorganiche che danno luogo con il blu di metilene a coppie ioniche (cianati, fluoruri, cloruri, nitrati, tiocianati, ecc.).

Interferenze negative vengono date da sostanze che, reagendo con i tensioattivi anionici, impediscono la formazione del sale con il blu di metilene (ammine, sali di ammonio quaternario, ecc.) Effettuando l'estrazione del sale colorato, com'è indicato nel seguito, dapprima mediante una soluzione alcalina di blu di metilene seguita da un trattamento con una soluzione acida dello stesso reattivo, dette interferenze (positive e negative) vengono notevolmente ridotte.

Altre interferenze negative possono essere date da specie capaci di ridurre il blu di metilene; nel caso di presenza di solfuri si deve procedere alla loro ossidazione con acqua ossigenata in ambiente alcalino (**).

(*) MBAS (Methylene Blue Active Substances): sostanze attive al blu di metilene.

(**) Se occorre, neutralizzare il campione prelevato secondo (7.3) ed aggiungere 10 mL di soluzione tampone (6.3) e alcune gocce di acqua ossigenata (6.9). Lasciare a riposo per 5 minuti e procedere come indicato in (7.1) a partire dal secondo comma. Ovviamente si eviterà di aggiungere altra soluzione tampone. Per alte concentrazioni di solfuri trovare sperimentalmente le condizioni operative più adatte.

Infine si è riscontrato che altre sostanze organiche, non tensioattive, possono dare interferenze positive a seguito di formazione di sali con il blu di metilene, sali estraibili in cloroformio. Soluzioni di sostanze di questo tipo, alle concentrazioni riportate in Tab. 1, addizionate con 1 mg/L di alchilbenzensolfonato (LAS), hanno dato i seguenti valori come MBAS:

Tabella 1: Interferenze positive date da sostanze organiche non tensioattive

Sostanze organiche interferenti	Concentrazioni (mg/L)	Valore trovato come MBAS (interferenti org.+LAS) in mg/L
Acido picrico	5,0	4,6
Acido naftalensolfonico	5,0	5,1
Acido 2-antrachinonsolfonico	1,0	1,7
Acido 1-antrachinonsolfonico	5,0	1,2
Acido 2-idrossi-1-naftalensolfonico	1,0	1,4

In caso di presenza accertata delle sostanze elencate in Tab. 1, per la loro eliminazione è necessario ricorrere alla tecnica di pre-estrazione, basata sull'insufflazione di azoto, descritta nella Sezione 5180 "Tensioattivi non ionici".

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

Il campione deve essere stabilizzato con l'1% (v/v) di formaldeide al 37% e conservato a 4°C allo scopo di ridurre al minimo l'attività batterica. L'analisi deve essere condotta preferibilmente entro le 24 ore successive al prelievo.

5. Apparecchiatura

5.1 Normale apparecchiatura da laboratorio

5.2 Spettrofotometro, predisposto per misure nell'intorno di 650 nm e corredato di celle da 1 cm e 5 cm.

Tutta la vetreria impiegata nel presente metodo deve essere accuratamente lavata con acqua, risciacquata con una soluzione metanolica di acido cloridrico 3 M (6.10) e quindi con acqua distillata e deionizzata.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua utilizzata deve essere distillata e/o deionizzata.

6.1 Soluzione concentrata di MBAS (1000 mg/L)

Sciogliere 1000 mg del sale sodico dell'acido dodecilbenzensolfonico in 1000 mL di acqua.

6.2 Soluzione diluita di MBAS (50 mg/L)

Prelevare esattamente 5 mL della soluzione concentrata di MBAS (6.1), trasferirli in un matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con acqua.

6.3 Soluzione tampone a pH 10

Sciogliere 24 g di idrogeno carbonato di sodio (NaHCO_3) e 27 g di carbonato di sodio anidro (Na_2CO_3) in acqua e diluire a 1000 mL.

6.4 Soluzione neutra di blu di metilene

Sciogliere 0,35 g di blu di metilene in 500 mL di acqua e diluire a 1000 mL. L'assorbanza della fase cloroformica della prova in bianco, misurata contro cloroformio, non deve superare 0,015 impiegando una cella con cammino ottico di 1 cm a 650 nm. Questa soluzione va preparata almeno 24 ore prima dell'uso. Inoltre i volumi da utilizzare nel presente metodo devono essere sempre preestratti con cloroformio.

6.5 Acido solforico concentrato (H_2SO_4) ($d=1,84$)

6.6 Soluzione acida di blu di metilene

Sciogliere 0,35 g di blu di metilene in 500 mL di acqua, aggiungere 6,5 mL di acido solforico concentrato (6.5) e diluire a 1000 mL con acqua. Anche in questo caso, l'assorbanza della fase cloroformica della prova in bianco deve rispondere alla condizione indicata al punto 6.4. Inoltre la soluzione, preparata almeno 24 ore prima dell'uso, deve essere pre-estratta con cloroformio.

6.7 Etanolo ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) al 95%

6.8 Cloroformio (CHCl_3), di recente distillazione.

6.9 Soluzione di acqua ossigenata (H_2O_2) al 30%

6.10 Soluzione 3 M di acido cloridrico in metanolo

Diluire 250 mL di acido cloridrico concentrato (HCl , $d=1,19$) in 750 mL di metanolo.

7. Procedimento

7.1 Curva di taratura per concentrazioni di MBAS comprese tra 0,05 e 0,5 mg/L

Prelevare esattamente 0,1 mL, 0,2 mL, 0,4 mL, 0,8 mL e 1 mL della soluzione diluita di MBAS (6.2) ed introdurla in imbuti separatori (da 250 mL) contenenti 100 mL di acqua.

Aggiungere in ciascun imbuto separatore 10 mL di soluzione tampone a pH 10 (6.3), 5 mL di soluzione neutra al blu di metilene (6.4) e 15 mL di cloroformio (6.8).

Agitare uniformemente e non troppo energicamente la miscela per un minuto. Lasciare stratificare e trasferire lo strato cloroformico inferiore in una seconda serie di imbuti separatori da 250 mL, contenenti 110 mL di acqua e 5 mL di soluzione acida di blu di metilene (6.6).

Agitare la miscela per un minuto, lasciate stratificare e trasferire le rispettive fasi cloroformiche, dopo averle fatte passare attraverso filtri di ovatta idrofila previamente trattati con etanolo (6.7) ed inumiditi con cloroformio, in matracci tarati da 50 mL.

Estrarre rispettivamente le soluzioni alcaline ed acide ancora due volte utilizzando 10 mL di cloroformio (6.8) alla volta, per la seconda e la terza estrazione. Filtrare gli estratti cloroformici attraverso gli stessi filtri di ovatta idrofila nei rispettivi matracci da 50 mL. Questi ultimi vanno portati a volume con il cloroformio utilizzato per il lavaggio dei filtri di ovatta idrofila. Miscelare bene e misurare l'assorbanza a 650 nm in celle con cammino ottico di 5 cm, contro il bianco ottenuto sottoponendo 100 mL di acqua deionizzata all'intera procedura descritta. Costruire la curva di taratura riportando in ascissa i μg di dodecilbenzensolfonato e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza.

7.2 Curva di taratura per concentrazioni di MBAS comprese tra 0,5 e 4 mg/L

Prelevare esattamente 1 mL, 2 mL, 4 mL, 6 mL, 8 mL della soluzione diluita di MBAS (6.2) ed introdurli in imbuti separatori (da 250 mL) contenenti rispettivamente 99 mL, 98 mL, 96 mL, 94 mL e 92 mL di acqua. Procedere come indicato al Paragrafo (7.1) a partire dal secondo comma. Utilizzare in questo caso per le misure di assorbanza celle con cammino ottico di 1 cm.

7.3 Determinazione

Prelevare una determinata quantità di campione, se necessario neutralizzarla ed introdurla in un imbuto separatore da 250 mL per prelievi fino a 100 mL e da 500 mL per prelievi fino a 400 mL, seguendo orientativamente le indicazioni riportate in Tab. 2. Se il campione da analizzare è inferiore a 100 mL, diluire a 100 mL con acqua.

Procedere alla determinazione dell'MBAS operando come indicato al Paragrafo (7.1), a partire dal secondo comma. Nel caso in cui il campione contenga quantità di solidi sospesi tali da creare problemi durante il processo di estrazione, si consiglia di procedere alla filtrazione del campione (sotto vuoto o in pressione) con filtri in fibra di vetro da 0,80 µm. Possono essere necessari più filtri se la quantità di solidi sospesi è tale da creare intasamento. Lavare i filtri utilizzati per la filtrazione con 10 mL di metanolo ciascuno ed aggiungere il metanolo raccolto al campione (in questo caso si dovrà tenere conto della diluizione del campione iniziale). Effettuare sempre parallelamente una determinazione del bianco con la procedura completa.

8. Calcoli

Dal valore dell'assorbanza del campione analizzato, ricavare mediante la curva di taratura la quantità in µg di tensioattivi anionici (MBAS) presenti nel campione. La concentrazione di tensioattivi anionici sarà data dalla seguente formula:

$$C = \frac{a}{V}$$

dove:

C = concentrazione (mg/L) di tensioattivi anionici MBAS (come dodecibelbenzenesolfonato di sodio)

a = quantità (µg) di tensioattivi anionici, come MBAS, ricavati dalla curva di taratura;

V = volume (mL) di campione prelevato per l'analisi.

Tabella 2: Indicazione orientativa dei volumi di campione da analizzare in funzione del presunto contenuto di tensioattivi anionici

Contenuto presunto di tensioattivo anionico (mg/L)	Volume di campione da prelevare (mL)
0,025-0,075	400
0,075-0,50	250
0,50-1,50	100
1,50-7,50	20
7,50-50,0	2

9. Qualità del dato

Determinazioni eseguite in quintuplicato da sei laboratori su campioni filtrati di acque di scarico (influyente ed effluente di un impianto di depurazione) hanno mostrato coefficienti di variazione, CV(%) = (scarto tipo/valore medio)·100, rispettivamente del 7% e 9%.

Per soluzioni sintetiche contenenti intorno a 0,3 mg/L di LAS, il recupero è risultato pari a circa il 111%.

BIBLIOGRAFIA

CEE (1982): "Determinazione dei tensioattivi anionici nelle prove di biodegradabilità", in: Direttiva del Consiglio 82/243/CEE del 31 marzo 1982, Cap. 3, Gazz. Uff. delle Comunità Europee, L. 109.

ISO (1984): "Determination of anionic surfactants", ISO 7875/1, 1st edition.

LONGWELL J. & MANIECE W.P. (1955): "Determination of Anionic Detergent in Sewage Effluent and River Water", *Analyst*, **80**, 176-171.

MATTHIJS E. & DE HENAU, H. (1987): "Determination of linear alkylbenzene sulphonates in aqueous samples sediments, sludges and soils using HPLC", *Tenside Detergents*, **24**, (4), 193-198.

MINISTRY OF HOUSING AND LOCAL GOVERNMENT (1966): "Supplement to the Eight Progress Report of the Standing Technical Committee on Synthetic Detergents", Appendix III, Method B (London, Her Majesty's Stationery Office).

WATERS J. & GARRIGAN J.T. (1983): "An improved microdesulphonation/gas liquid chromatography procedure for the determination of linear alkylbenzene sulphonates in U.K. rivers", *Wat. Res.*, **17**, 1549-1562.

5180. Tensioattivi non ionici

Introduzione

I tensioattivi non ionici sono costituenti fondamentali dei formulati impiegati nella detergenza domestica ed industriale. La loro presenza in acque superficiali e sotterranee è sempre indice di inquinamento antropico.

Con il termine di tensioattivi non ionici si intende l'insieme delle molecole organiche caratterizzate dalla presenza di una componente idrofobica (catena idrocarburica lineare o ramificata) e di una idrofila non carica (gruppo etossilato etero, estereo o ammidico).

1. Principio del metodo

I tensioattivi non ionici formano con il reattivo di Dragendorff ($\text{KBiI}_4 + \text{BaCl}_2$ in acido acetico glaciale) un precipitato nel quale il rapporto di combinazione Bi-tensioattivo è circa 1:1. Il precipitato viene disciolto e il bismuto presente viene titolato per via potenziometrica con pirroli-dinditiocarbammato di sodio (NaPDC) che lo complessa nel rapporto 3:1 (3 NaPDC:1 Bi).

2. Campo di applicazione

Questo metodo permette la determinazione dei tensioattivi non ionici etossilati (BIAS)* contenuti da 6 a 30 gruppi ossietilenici, in acque di scarico e naturali nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0,05 mg/L e 0,50 mg/L.

L'estensione del campo di applicazione del metodo alle basse concentrazioni (0,01-0,05 mg/L) è possibile pur comportando una diminuzione della precisione del metodo stesso.

3. Interferenze e cause di errore

Nelle condizioni del metodo i tensioattivi cationici interferiscono positivamente poichè danno luogo alla formazione di un precipitato con lo iodobismutato di bario. Il ricorso a saggi di ricerca qualitativa (es. blu di disulfine) non è sempre sufficiente ad accertare la loro presenza in campioni ambientali in quanto la contemporanea presenza di tensioattivi anionici può mascherarli.

L'interferenza di tensioattivi anionici è stata verificata in campioni di effluenti da impianti di trattamento biologico caratterizzati da concentrazioni elevate (≥ 1 mg/L) di tensioattivi anionici.

Sulla base delle considerazioni esposte, è assolutamente indispensabile nel caso di campioni di acqua di scarico procedere alla purificazione dell'estratto su resina cationica. In questi stessi campioni anche il passaggio su resina anionica diventa importante qualora siano presenti in quantità apprezzabili interferenze anioniche.

In campioni di acque superficiali a concentrazioni di BIAS comprese tra 0,01 mg/L e 0,05 mg/L, la variazione di BIAS ottenuta dopo passaggio su resine è paragonabile allo scarto tipo dei valori stessi. Nel contempo le procedure di purificazione rendono il metodo più laborioso e possono determinare una diminuzione della qualità del dato. In questo caso è opzionale procedere alla purificazione dell'estratto.

* Sostanze attive allo iodio-bismutato

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

Il campione deve essere stabilizzato con l'1% (v/v) di formaldeide al 37% e conservato a 4°C allo scopo di ridurre al minimo l'attività batterica. L'analisi deve essere condotta preferibilmente entro le 24 ore successive al prelievo.

5. Apparecchiature

5.1 Normale vetreria di laboratorio

5.2 Apparecchio di estrazione (sublatore) in vetro da 1000 mL (Fig. 1).

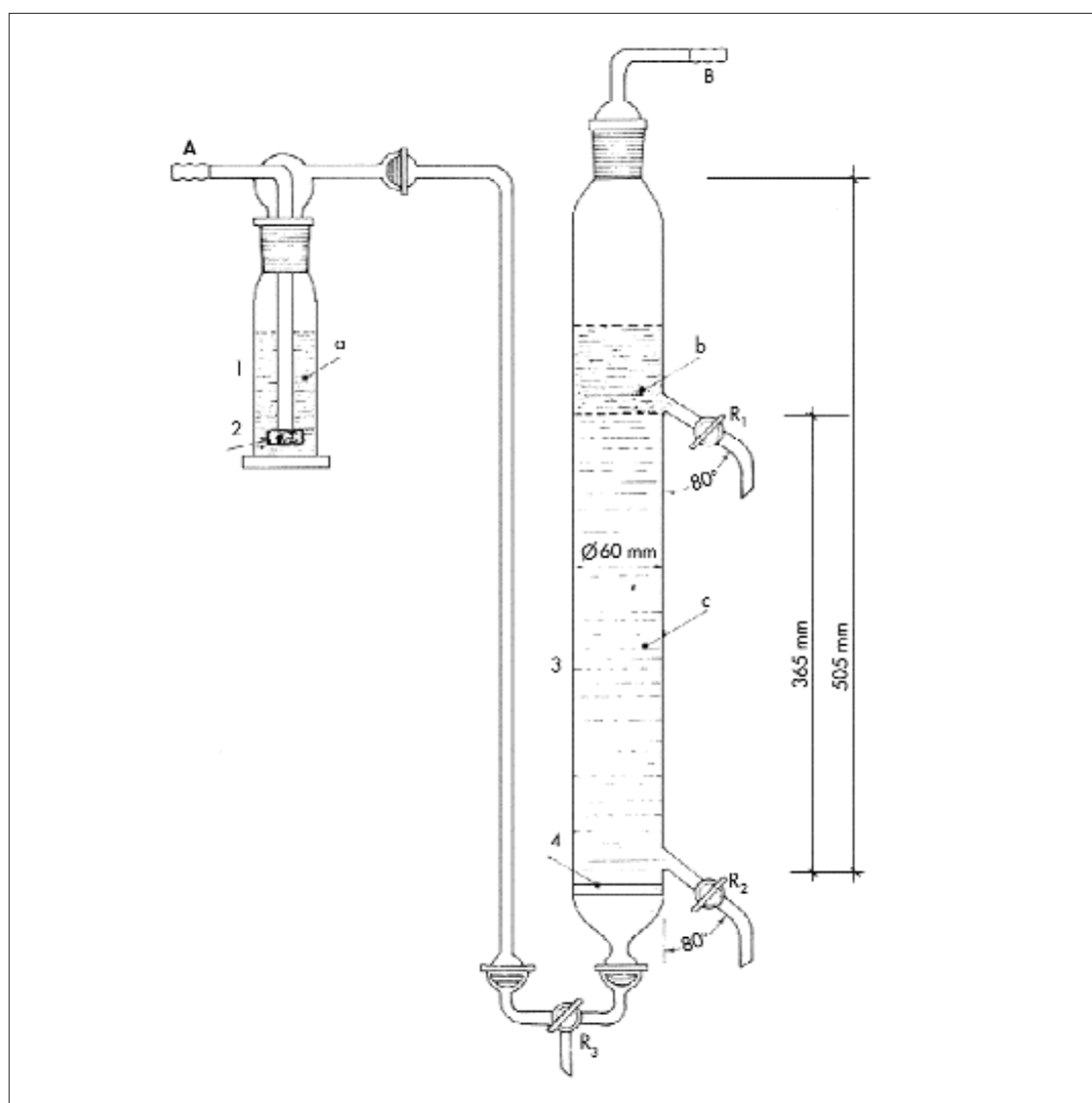


Figura 1: Apparecchio di estrazione per tensioattivi (1: Bottiglia di lavaggio; 2: Setto poroso; 3: Colonna di strip-paggio; 4: Setto di vetro sinterizzato; a e b: Acetato di etile; c: campione in esame (soluzione acquosa); A: Ingresso azoto; B: Uscita azoto; R: Rubinetti).

5.3 *Colonne a scambio ionico in vetro* (d=10 mm; h=150 mm), provviste di setto poroso in vetro sinterizzato, rubinetto di teflon nella parte inferiore, serbatoio (capacità 80 mL) e tappo smerigliato nella parte superiore.

5.4 *Buretta da 25 mL graduata* in 0,05 mL.

5.5 *Buretta da 5 mL graduata* in 0,01 mL.

5.6 *Crogiolo filtrante in vetro*, diametro 47 mm, porosità 3÷15 µm.

5.7 *Titolatore potenziometrico* con sensibilità di 1 mV, munito di elettrodi di platino e di calomelano.

5.8 *Agitatore elettrico* regolabile ad alta velocità.

Nota 1: *in alternativa a 5.4 e 5.5 si può utilizzare un dosatore automatico. In alternativa a 5.4, 5.5, 5.7 e 5.8 si può utilizzare un titolatore automatico.*

Nota 2: *tutta la vetreria deve essere scrupolosamente pulita ed accuratamente risciacquata con acqua distillata e deionizzata. Metanolo ed acetato di etile possono essere impiegati per lavare vetreria e sublatori tra un'analisi e l'altra. Per evitare più lunghe e laboriose operazioni di pulizia è consigliabile disporre di sublatori, colonne a scambio ionico e, in generale, di vetreria dedicata ai diversi tipi di campioni da analizzare (bianco, acqua di scarico, acqua superficiale).*

6. Reattivi

Tutte le soluzioni devono essere preparate impiegando acqua distillata o deionizzata.

6.1 *Idrogeno carbonato di sodio*

6.2 *Cloruro di sodio*

6.3 *Acetato di etile*

6.4 *Metanolo*

6.5 *Soluzione metanolica di porpora bromocresolo (1 g/L)*

6.6 *Soluzione acquosa di acido cloridrico (d=1,19) all'1% (v/v)*

6.7 *Soluzione A*

Sciogliere 1,7 g di nitrato basico di bismuto [$4\text{BiNO}_3(\text{OH})_2 \cdot \text{BiO}(\text{OH})$] in 20 mL di acido acetico glaciale e portare a 100 mL con acqua. Sciogliere 65 g di ioduro di potassio in 200 mL di acqua e travasarli, unitamente alla prima soluzione, in un matraccio tarato da 1000 mL. Aggiungere 200 mL di acido acetico glaciale e portare a volume con acqua. Preparare questo reattivo settimanalmente e conservarlo in bottiglia di vetro scuro.

6.8 *Soluzione B*

Introdurre 290 g di cloruro di bario ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in un matraccio tarato da 1000 mL, sciogliere con acqua e portare a volume.

6.9 *Reattivo di precipitazione* formato da due volumi di soluzione A e un volume di soluzione B.

6.10 *Acido acetico glaciale*6.11 *Soluzione di tartrato di ammonio*

Introdurre 20 g di tartrato di ammonio in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.12 *Soluzione di ammoniaca al 16%*6.13 *Soluzione tampone*

Porre 40 g di idrossido di sodio in un matraccio tarato da 1000 mL, aggiungere 500 mL di acqua fino a completa dissoluzione, 120 mL di acido acetico glaciale e, dopo raffreddamento, portare a volume con acqua.

6.14 *Alcool amilico*6.15 *Soluzione 0,0005 N di NaPDC*

Porre 103 mg di NaPDC e 0,5 g di idrogeno carbonato di sodio, 10 mL di alcool amilico in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua. Controllare il fattore (f) della soluzione settimanalmente utilizzando la soluzione di solfato di rame 0,0005 N.

6.16 *Soluzione acquosa di acido solforico 1 M*6.17 *Soluzione 0,0005 N di solfato di rame*

Pesare 1,249 g di solfato di rame ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), aggiungere 50 mL di acido solforico 1 M e portare a volume in un matraccio tarato da 1000 mL con acqua. Travasare 50 mL di questa soluzione in un matraccio tarato da 1000 mL, aggiungere 10 mL di acido solforico 1 M e portare a volume con acqua.

6.18 *Resina a scambio cationico (Amberlite IR-120 Plus o equivalente).*6.19 *Resina a scambio anionico (Amberlite IRA-910 o equivalente).*6.20 *Soluzione metanolica di HCl 0,1 M*6.21 *Soluzione metanolica di NaOH 0,1 M***7. Procedimento**7.1 *Estrazione dei tensioattivi*

Effettuare l'estrazione su un'aliquota di campione contenente da 0,05 mg/L a 0,5 mg/L di tensioattivo non ionico etossilato espresso come BIAS, utilizzando il sublattore (5.2) descritto in Fig. 1.

Qualora il contenuto di solidi sospesi nel campione da sottoporre a sublazione sia tale da compromettere un efficiente funzionamento (attraverso l'occlusione dei pori del setto del sublattore) o da richiedere una successiva laboriosa operazione di pulizia del sublattore, si consiglia la preventiva rimozione dei solidi sospesi mediante filtrazione sotto vuoto su filtri (0,80 μm) in fibra di vetro prelavati con metanolo. I tensioattivi adsorbiti sul materiale sospeso vengono recuperati lavando il filtro stesso con 10 mL di metanolo, che si aggiungono all'acqua filtrata.

Aggiungere ad un litro di campione, o a un volume inferiore portato ad un litro con acqua, 100 g di cloruro di sodio e 5 g di idrogeno carbonato di sodio. Trasferire quindi il campio-

ne nel sublatore aggiustandone eventualmente il volume con acqua fino al livello del rubinetto superiore di scarico R₁.

Introdurre successivamente 100 mL di acetato di etile e procedere alla sublazione con un flusso di azoto fatto preliminarmente passare in una bottiglia di lavaggio contenente acetato di etile. Regolare il flusso dell'azoto ad una portata di 30-40 L/h, innalzando gradualmente il flusso fino a raggiungere il massimo consentito dalla condizione di non turbolenza all'interfaccia tra i due fluidi. Protrarre la sublazione per dieci minuti.

Lasciar separare le due fasi e recuperare quindi la fase organica da R₁ trasferendola in un imbuto separatore da 250 mL. Ripetere l'estrazione con 100 mL di acetato di etile operando come precedentemente indicato e trasferire la fase organica nello stesso imbuto separatore da 250 mL.

Se durante il processo di estrazione la fase organica diminuisce di oltre il 20%, l'operazione deve essere ripetuta. Lavare con una spruzzetta adibita allo scopo la parte superiore del sublatore con 25 mL di acetato di etile ed unirli alle frazioni precedentemente raccolte. Dopo aver scaricato la fase acquosa che nel frattempo si è separata, porre la fase organica in un pallone da 250 mL ed evaporarla mediante evaporatore rotante (T=35°C).

7.2 Preparazione del bianco

Riempire un secondo sublatore riservato al bianco fino al livello del rubinetto superiore con acqua deionizzata preventivamente addizionata di NaCl e NaHCO₃ in quantità pari a quelle usate per il campione. Procedere alla sublazione secondo le modalità già indicate per il campione. Sottoporre il residuo ottenuto dalla rotoevaporazione a tutte le fasi previste dalla procedura per l'analisi del campione.

7.3 Eliminazione dei tensioattivi cationici e anionici

7.3.1 Utilizzare le colonne a scambio ionico (5.3). Sono necessarie due colonne per ciascuna apparecchiatura di estrazione. Per preparare la colonna di scambio cationico trasferire circa 7 g di resina cationica forte (6.18) in 50 mL di metanolo e versare la sospensione in colonna in modo da trasferirvi quantitativamente la resina. Far defluire il solvente senza far andare a secco la resina, quindi attivarla attraverso la percolazione di 20 mL di una soluzione metanolica di HCl (6.20) e successivo lavaggio con metanolo, fino a pH neutro (verificato con cartina indicatore universale).

Per preparare la colonna di scambio anionico, utilizzare la resina a scambio anionico forte (6.19), seguendo le indicazioni sopra riportate per la colonna a scambio cationico. Attivare la colonna con 20 mL di soluzione metanolica di NaOH (6.21) e successivo lavaggio con metanolo fino a pH neutro. Mantenere sempre le colonne in metanolo.

7.3.2 Purificazione dell'estratto. Far scorrere sulle pareti interne del pallone 20 mL di metanolo e favorire la ridissoluzione del residuo sul fondo del pallone mediante vigorosa agitazione manuale o su piano oscillante, o immersione in bagno ad ultrasuoni per dieci minuti. Percolare il residuo goccia a goccia dapprima sulla resina cationica e poi su quella anionica. Lavare quindi le due colonne con 60 mL di metanolo preventivamente utilizzati per il risciacquo del pallone contenente l'estratto ed unire la soluzione di lavaggio a quella del campione.

Si consiglia di riservare una colonna cationica ed una anionica esclusivamente alla purificazione del bianco. Rigenerare le colonne dopo ogni uso seguendo le modalità espote in (7.3.1).

7.4 Precipitazione e filtrazione

Tirare a secco in evaporatore rotante (T=40°C) la soluzione metanolica contenente l'estratto dopo averla raccolta in un pallone da 250 mL. Riprendere il residuo con 5 mL di metanolo secondo le modalità espote in 7.3.2. Versare la soluzione in un beaker, lavare il pallone con 40 mL di acqua e trasferire l'acqua di lavaggio nel beaker.

Acidificare con 0,5 mL di HCl all'1% (6.6) ed agitare con agitatore magnetico. Aggiungere gradualmente 30 mL della soluzione precipitante (6.9) preparata di fresco miscelando 20 mL di soluzione A (6.7) con 10 mL di soluzione B (6.8). Prolungare l'agitazione per dieci minuti e poi lasciare decantare il precipitato formatosi per altri dieci minuti.

Per la filtrazione del precipitato utilizzare un crogiolo filtrante sul cui setto è posto un filtro in fibra di vetro (Whatman GF-F, porosità 0,8 μm) dello stesso diametro. Porre il crogiolo su una beuta da vuoto da 500 mL collegata alla linea da vuoto. Bagnare preventivamente il filtro con pochi millilitri di acido acetico glaciale e premerlo lungo i bordi con una bacchetta di vetro per farlo aderire al setto del crogiolo filtrante. Versare quindi la soluzione contenente il precipitato al centro del filtro, con regolarità, in modo che non possa aggirare il filtro passando direttamente sul setto sottostante.

Una volta filtrata tutta la soluzione, lavare il precipitato con cinque aliquote da 30 mL di acido acetico glaciale, ciascuna delle quali viene utilizzata preventivamente per sciacquare accuratamente il beaker di precipitazione ed è poi fatta percolare sul filtro secondo le modalità precedentemente esposte. Staccare, con l'ausilio di una pinzetta, il filtro dalla superficie del setto e porlo in un beaker da 250 mL.

Lavare il crogiolo filtrante, sul quale può comunque essersi depositato un poco di precipitato, con 20 mL di soluzione calda (80°C) di tartrato ammonico (6.11), che viene fatta percolare attraverso il setto e raccolta nel beaker contenente il filtro. Aggiungere nel beaker, sotto agitazione, altri 20 mL di soluzione calda di tartrato ammonico per sciogliere completamente il precipitato (si ha la completa decolorazione del filtro).

Spostare il filtro con una bacchetta di vetro facendolo aderire alla parete laterale del beaker e lavarlo abbondantemente con acqua usando una spruzzetta, portando il volume finale della soluzione a 200 mL.

7.5 *Titolazione potenziometrica finale del bismuto*

Aggiungere alla soluzione poche gocce di porpora bromocresolo (6.5) e, sotto agitazione, una soluzione di NH_3 al 16% (6.12) fino al viraggio dell'indicatore dal giallo al porpora. Aggiungere quindi 10 mL di soluzione tampone (6.13) e procedere alla titolazione sotto agitazione con NAPDC 0,0005 N (6.15), facendo attenzione che la punta della buretta contenente il titolante risulti immersa nella soluzione da titolare.

È necessario aspettare che il potenziale si stabilizzi prima di iniziare la titolazione. Se non si dispone di un sistema automatico di erogazione del titolante, aprire il rubinetto della buretta molto lentamente e regolare il flusso a un valore costante (20-50 $\mu\text{L}/\text{min}$ per BIAS intorno a 50 $\mu\text{g}/\text{L}$). Campionare il potenziale a tempi regolari, infittendo la frequenza di misura quando il potenziale comincia a variare più velocemente (prossimità del punto equivalente). Il punto equivalente viene determinato in maniera soddisfacente attraverso il diagramma dei rapporti incrementali (DV/Dv) in funzione del volume di titolante (v).

Dispositivi costituiti da un sistema automatico di erogazione del titolante, titolatore potenziometrico e gestione dati automatizzato possono ridurre notevolmente i tempi di analisi nonché aumentare la qualità delle stesse.

Allo scopo di ridurre la deriva di potenziale durante le titolazioni risulta di fondamentale importanza una frequente pulizia dell'elettrodo di platino. Tale pulizia va effettuata con apposita carta smeriglio.

8. Calcoli

Per calcolare i tensioattivi non ionici etossilati, espressi come BIAS, utilizzare la seguente relazione:

$$C = \frac{(a-b) \cdot F \cdot f}{v}$$

dove:

C = concentrazione (mg/L) di tensioattivi non ionici etossilati (BIAS);

a = volume (mL) di soluzione di NaPDC 0,0005 N utilizzati per la titolazione del campione;

b = volume (mL) di soluzione di NaPDC 0,0005 N utilizzati per la titolazione del bianco;

F = fattore di conversione specifico per ogni tensioattivo non ionico etossilato (54 per NP-10EO);

f = fattore di correzione del titolo della soluzione di NaPDC (6.15);

v = volume (mL) di campione.

9. Qualità del dato

Per quanto concerne la precisione, analisi effettuate da sei laboratori su 5 repliche di campioni reali aventi concentrazioni comprese nel campo di applicazione del metodo (0,05-0,5 mg/L) hanno fatto registrare valori del coefficiente di variazione, $CV(\%) = (\text{scarto tipo/valore medio}) \cdot 100$, compresi tra il 10% e il 20%. Per concentrazioni di BIAS inferiori a 0,05 mg/L, valori del coefficiente di variazione compresi tra il 25% e il 35% si possono ritenere soddisfacenti.

Per quanto riguarda l'accuratezza, determinazioni eseguite su soluzioni sintetiche a basso contenuto di BIAS (0,05 mg/L) hanno evidenziato una sovrastima dei tensioattivi non ionici del 10-20%. Per concentrazioni superiori a 0,1 mg/L, lo scostamento dal valore vero è risultato del 5%.

Risultati ottenuti analizzando campioni di acqua di scarico (influenti ed effluenti di impianti di depurazione) nonché quelli riportati in letteratura evidenziano un'accuratezza inferiore a quella trovata per campioni sintetici.

BIBLIOGRAFIA

ARPINO A., CALATRONI C. & IACINI G. (1974): "La microdeterminazione dei tensioattivi non ionici etossilati", *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **51**, 140-145.

BROWN D., DE HENAU H., GARRIGAN J.T., GERIKE P., HOLT M., KECK E., KUNKEL E., MATTHIJS F., WATERS J. & WATKINSON R.J. (1986): "Removal of Nonionics in a Sewage Treatment Plant", *Tenside Detergents*, **23**, (4), 190-195.

BROWN D., DE HENAU H., GARRIGAN J.T., GERIKE P., HOLT M., KECK E., KUNKEL E., MATTHIJS F., WATERS J. & WATKINSON R.J. (1987): "Removal of Nonionics in a Sewage Treatment Plant II", *Tenside Detergents*, **24**, (1), 14-19.

CAPRI S., ZANETTE S., MARCOMINI A. & PATROLECCO L. (1996): "Determinazione di tensioattivi non ionici nelle acque", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, marzo 1996, 14-23.

ISO (1984): "Determination of non ionic surfactants", ISO 7875/2.

O.C.D.E. (1976): "Methode proposee pour la determination de la biodegradabilite des agents de surface utilises dans le detergents synthetiques", Direction de l'environnement, Paris.

WATERS J., GARRIGAN J.T. & PAULSON M. (1986): "Investigation into the scope and limitations of the bismuth active substances procedure (Wickbold) for the determination of nonionic surfactant in environmental samples", *Wat. Res.*, **20**, (2), 247-253.

WICKBOLD R. (1972): "Zur Bestimmung nichtionischer Tenside Fluss und Abwasser", *Tenside Detergents*, **9**, 173-177.